QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN DER POLYMEREN UND MONOMEREN ANTEILE VON IgM UND IgA BEIM HAUSHUHN

WOLFRAM DORN

Diss München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0010

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN DER POLYMEREN UND MONOMEREN ANTEILE VON IgM UND IgA BEIM HAUSHUHN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
WOLFRAM DORN
aus
Ingolstadt/Donau

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. *Einleitung*

2. *Material und Methoden*
2.1. Tiermaterial
2.2. Blutentnahme und Serumgewinnung
2.3. Gelfiltration
2.3.1. Trennung der Immunglobuline
2.3.2. Molekulargewichtsbestimmung
2.3.3. Konzentrierung der Eluate
2.3.4. Isolierung der Standardsubstanzen
2.4. Methoden zur quantitativen Bestimmung
2.4.1. Proteinbestimmung
2.4.2. Rocket-Immunelektrophorese
2.5. Bestimmungsmethoden, Charakterisierung und Reinheitsprüfung
2.5.1. Immunelektrophorese
2.5.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese
2.5.3. Gewinnung der Antiseren
2.5.4. Statistische Methoden

3. *Ergebnisse*
3.1. Gelfiltration
3.1.1. Molekulargewichtsbestimmung
3.1.2. Chromatographie der Serumimmunglobuline
3.2. Bestimmung der Proteinkonzentrationen
3.3. Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen
3.4. Bestimmung der Polymeren -und Monomeren-konzentrationen von IgM und IgA bei UM-B19 Hühnern und Kontrollhühnern
3.4.1. IgM bei zwei Monate alten Hühnern
3.4.2. IgM bei vier Monate alten Hühnern

3.4.3. IgM bei sechs Monate alten Hühnern
3.4.4. Monomeres IgM - ein Vergleich der drei Altersgruppen
3.4.5. IgA bei zwei Monate alten Hühnern
3.4.6. IgA bei vier Monate alten Hühnern
3.4.7. IgA bei sechs Monate alten Hühnern
3.4.8. Monomeres IgA - ein Vergleich der drei Altersgruppen
3.5. Einfluß von Geschlecht und Alter auf die Serum-Immunglobulinkonzentrationen bei UM-B19 Hühnern und Kontrollhühnern
3.5.1. Immunglobulin M
3.5.2. Immunglobulin A
3.5.3. Immunglobulin G
3.6. Serum-Immunglobulinkonzentrationen vor und nach Säulentrennung

4. *Diskussion*
4.1. Besprechung der Methoden
4.2. Besprechung der Ergebnisse

5. *Zusammenfassung*

6. *Summary*

7. *Literaturverzeichnis*

1. *Einleitung*

Alle Wirbeltiere besitzen ein körpereigenes Immunsystem, das sich mit den täglich in den Körper eindringenden Fremdstoffen, seien es Bakterien, Viren oder größere Moleküle verschiedener Stoffklassen, auseinandersetzt. Dieses System kann mehrfach unterteilt werden: einmal nach der Wirkungsqualität zwischen spezifischer und unspezifischer Immunantwort, zum anderen nach den Wirkungsträgern zwischen einem zellulären und humoralen System.

Das humorale Immunsystem besteht aus passiv beweglichen Antikörpern, welche den Plasmazellen entstammen. Diese Antikörper sind Plasmaproteine (Gammaglobuline), die bezüglich ihrer Ladung, biologischer Aktivität und Struktur sehr heterogen sind. Allen Immunglobulinen liegt eine einheitliche Grundstruktur zugrunde: sie bestehen aus zwei Paaren von jeweils identischen Ketten, die entsprechend ihrer Molekulargewichte als leichte (L) bzw. schwere (H) Ketten bezeichnet werden, und über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Fleischmann et al., 1963; Edelmann et al., 1964) (Abb.1).

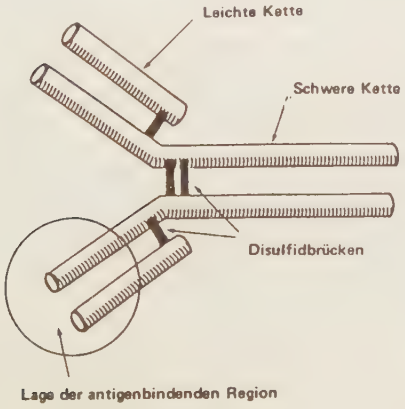

Abb.1: Schematische Darstellung der Grundstruktur eines Antikörpers (Tizard, 1981).

Aufgrund verschiedener Aminosäurensequenzen der H-Ketten werden die Immunglobuline in Klassen (z.B. IgG, IgA, IgM) eingeteilt. Nach Ultrazentrifugation können drei Gruppen von Antikörpern unterschieden werden:

1. Immunglobuline mit einem Molekulargewicht von ca. 160 000 Dalton und einem Sedimentationskoeffizienten von ca. 7S.
2. Immunglobuline mit einem Molekulargewicht von 300 000 bis 380 000 Dalton (9-11S).
3. Immunglobuline mit einem Molekulargewicht von 800 000 bis 1 000 000 Dalton (17-19S).

Die Heterogenität der Molekulargewichte beruht zum einen auf den unterschiedlichen H-Kettenstrukturen der einzelnen Klassen, zum anderen auf dem Vorkommen von monomeren und polymeren Formen. Letztere bestehen aus zwei oder mehreren monomeren Untereinheiten, welche über Disulfidgruppen verbunden sind (Abb.2/3).

Das IgG des Menschen repräsentiert mit einem Anteil von ca. 70% am gesamten Immunglobulinpool den wichtigsten Antikörper. Es tritt im Serum ausschließlich als monomeres 7S-Molekül auf.

Die humanen Immunglobuline der A-Klasse erfüllen vorwiegend auf der Haut und auf den Schleimhäuten ihre Abwehraufgaben und treten in allen Körpersekreten wie z.B. der Tränenflüssigkeit, dem Speichel, der Galle und im Darmsekret als 11S-Dimere auf. Dabei sind die beiden monomeren Untereinheiten durch ein "joining-protein", auch J-Kette genannt, miteinander verbunden (Halpern and Koshland, 1970). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des IgA Moleküls mit J-Kette und Sekretkomponente.

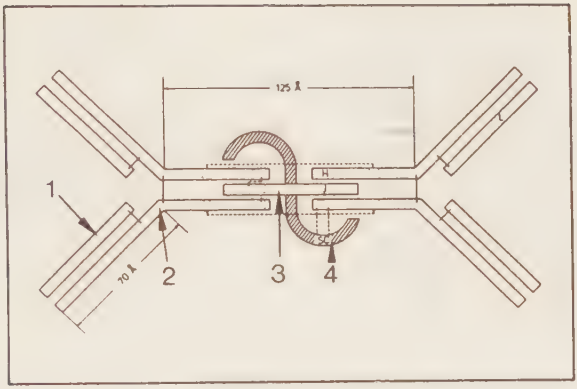

Abb.2: Schematische Darstellung einer dimeren IgA-Struktur (Pardo et al., 1979)
1- Leichte Kette
2- Schwere Kette
3- J-Kette
4- Sekretkomponente

Die Funktion der J-Kette ist noch unklar. Sie scheint Voraussetzung, wenn nicht sogar Bedingung für die Polymerisierung von monomerem IgA zu sein (Della Corte and Parkhouse, 1973).
Im Serum des Menschen überwiegen die monomeren Strukturen (7S-IgA) mit einem prozentualen Anteil von 90% am Gesamt-IgA (André et al., 1978; Kutteh et al., 1982). Aber auch dimeres IgA und höhere Molekülaggregate (>11S) werden im humanen Serum beschrieben (Kortt et al.,1978).

Das IgM ist ein Makromolekül und besitzt beim Menschen ein Molekulargewicht von ca. 900 000 Dalton (19S). Es tritt in der Regel als Pentamer auf. Die fünf monomeren Untereinheiten sind untereinander über Interdisulfidbrücken verbunden (Abb.3).

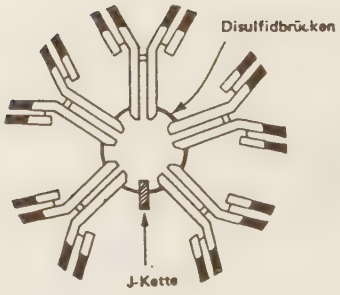

Abb.3: Schematische Darstellung eines pentameren IgM-Moleküls (Tizard, 1981).

Bei einigen pathologischen Erscheinungen wird aber auch das Auftreten von freien monomeren Untereinheiten in humanem Serum beschrieben. Bei diesen Erkrankungen handelt es sich um maligne Tumorerkrankungen (Solomon and Kunkel, 1967), um bestimmte Formen von degenerativen Lebererkrankungen (Fakunle et al., 1979; Taal et al., 1982), um gewisse Infektionserkrankungen (Masseyeff et al.,1972; Fakunle and Greenwood, 1977), sowie um Autoimmunerkrankungen (Harisdangkul et al., 1975). Der zelluläre Herkunftsort des 7S-IgM ist noch nicht endgültig geklärt.

Beim Menschen können noch zwei weitere Immunglobulinklassen, nämlich IgE und IgD, unterschieden werden. Als aviäre Antikörper sind bisher aber nur die drei Hauptklassen IgG, IgA und IgM als dem Säuger homologe Immunglobuline beschrieben worden.

IgG liegt auch beim Huhn, wie beim Säuger, ausschließlich als monomere Struktur vor.

Das IgA des Huhnes wurde erst Anfang der 70er Jahre als ein dem Säuger-IgA homologes Immunglobulin beschrieben (Lebacq-Verheyden et al., 1972; Leslie and Martin, 1973). Es liegt, wie auch beim Menschen, im Serum sowohl als

Monomer, als Dimer und in höheren Molekülaggregaten vor (Leslie and Martin, 1973; Sanders and Case, 1977).

Das Makroglobulin IgM wurde bislang beim Huhn ausschließlich als Pentamer beschrieben. Frei im Serum vorkommendes monomeres IgM konnte aber von Schranner et al. (1982) im Serum von dysgammaglobulinämischen Hühnern der Linie UM-B19 nachgewiesen werden.

Ein Teil der Nachkommen dieser UM-B19-Linie weisen eine genuine Dysgammaglobulinämie auf; im Sinne stark erhöhter IgM und IgA-Serumkonzentrationen, bei sehr geringem bis fehlendem IgG. Der andere Teil der Nachkommen verhält sich bezüglich des Serumimmunglobulinmusters annähernd wie immunologisch intakte Hühner und wird deshalb als normogammaglobulinämisch bezeichnet (Lösch et al., 1972; Fiedler et al., 1980).

Bei allen drei eben angesprochenen Immunglobulinklassen des Huhnes bestehen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte Differenzen zum Menschen. Ein Vergleich ist in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Über die monomeren Formen des aviären IgA ist noch wenig, über die des aviären IgM, außer seinem Vorkommen bei immunologisch defekten Hühnern der Linie UM-B19 nichts bekannt.
Deshalb war es von Interesse diese monomeren Strukturen beim genetisch intakten und genuin genetisch defekten Huhn quantitativ zu untersuchen und zu vergleichen. Um eine eventuelle Alters - bzw. Geschlechtsabhängigkeit nachweisen zu können, wurde mit Serum von zwei, vier und sechs Monate alten Tieren gearbeitet und männliche

Tab.1: Sedimentationskonstanten und Molekulargewichte der drei Hauptklassen IgG, IgA und IgM beim Menschen (nach Rolle/Mayr, 1978).

Immunglobulin-klasse	Sedimentations-konstante (Svedberg)	Molekular-gewicht (Dalton)
IgG	7S	160 000
IgA monomer	7S	170 000
IgA polymer	9S	--- ---
	11S	385 000
	13S	--- ---
IgM polymer	19S	900 000

Tab.2: Sedimentationskonstanten und Molekulargewichte der drei Hauptklassen IgG, IgA und IgM beim Huhn.

Immunglobulin-klasse	Sedimentations-konstante (Svedberg)	Molekular-gewicht (Dalton)	Quelle
IgG	7S	170 000	Leslie and Clem (1970)
IgA monomer nach Reduktion	7S	170 000 bis 180 000	Leslie and Martin (1973)
IgA polymer	11S	350 000 bis 360 000	Leslie and Martin (1973)
	11,9-16,2S	--- ---	Bienenstock et al. (1973)
	17-19S	--- ---	Sanders and Case (1977)
IgM monomer nach Reduktion	7S	ca.175 000	Leslie and Martin (1973)
IgM polymer	17,6S	--- ---	Leslie and Clem (1970)
	-- --	860 000	Kobayashi and Hira (1980)

und weibliche Tiere getrennt ausgewertet. Das Ziel dieser Untersuchung war es, mit den gewonnenen Erkenntnissen, folgende Fragen beantworten zu können:

1. Kann 7S-IgM außer bei dysgammaglobulinämischen Hühnern auch bei normogammaglobulinämischen und immunologisch intakten Hühnern nachgewiesen werden? Wie hoch ist der Anteil des 7S-IgM bzw. 7S-IgA an den betreffenden Serumgesamtkonzentrationen?
2. Kann durch den Vergleich von dysgammaglobulinämischen Hühnern mit genetisch intakten Hühnern die noch umstrittene Herkunft des humanen 7S-IgM einer Klärung näher gebracht werden?
3. Kann durch die Quantifizierung der monomeren Strukturen die Dysgammaglobulämie der UM-B19-Linie näher charakterisiert werden?
4. Liegt bezüglich der Monomerenkonzentrationen von IgA bzw. IgM eine Alters - und Geschlechtsabhängigkeit vor?

2. *Material und Methoden*

2.1. Tiermaterial

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden verwendet:

a) zwei, vier und sechs Monate alte dys- und normogammaglobulinämische Hühner der Zuchtlinie UM-B19 (Lösch et al., 1982)
b) zwei, vier und sechs Monate alte Hühner der Heisdorf-Nelson-Lohmann (HNL)-Linie als Kontrolltiere
c) sechs Monate alte Hühner der White-Rock-Linie als Kontrolltiere

Alle Tiere wurden unter denselben konventionellen Bedingungen - in Käfigen auf Gitterrosten - aufgezogen und gehalten. Sie erhielten ihrer Altersgruppe entsprechend pelletiertes Mischfutter nach DLG-Standard und Frischwasser zur freien Verfügung.

2.2. Blutentnahme und Serumgewinnung

Von den einzelnen Tieren wurden im Alter von zwei, vier und sechs Monaten Blutproben gesammelt. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena ulnaris. Die Proben wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Anschließend zentrifugierte man die Proben 15 Minuten bei 3000/Min. Das Serum konnte dann als Überstand abpipetiert werden. Bis zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline wurden die Serumproben bei -40°C in Polystyrolröhrchen gelagert.

2.3. Gelfiltration

2.3.1. Trennung der Immunglobuline

Die Trennung der Immunglobuline erfolgte an Ultrogel AcA 34[1] (Fa.LKB) in einer 1,6 x 100 cm Glassäule mit Kühlmantel (Fa.LKB). Die Säule war hydrostatisch gepackt und mit 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0[2] 24 Stunden lang bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/h äquilibriert worden. Jeweils 2 ml Serum wurden mittels einer Pumpe (Perpex;Fa.LKB) auf die Säule aufgetragen . Die Trennung erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 13 ml/h. Der Proteingehalt des Eluates wurde kontinuierlich bei 280 nm (Uvicord S 2138; Fa. LKB) gemessen und durch einen Schreiber (Fa.LKB) aufgezeichnet. Ein zeitgesteuerter (30 Min/Fraktion) Fraktionssammler (Ultrorac 7000; Fa. LKB) fing das Eluat auf. Entsprechend dem Schreiberdiagramm sammelte man die Fraktionen unter den Gipfeln.

2.3.2. Molekulargewichtsbestimmung

Als Eichsubstanzen fanden Verwendung:

1. Ovalbumin (Fa.Serva)	45 000 Dalton
2. Albumin (Rind; Fa.Serva)	67 000 Dalton
3. IgG (Rind; Fa.Serva)	150 000 Dalton
4. Aldolase (aus Kaninchenmuskel;Fa.Pharmacia)	158 000 Dalton

---

[1] - 3% Acrylamid
- 4% Agarose
- Fraktionierungsbereich:20 000-350 000 Dalton

[2] 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0:
- 1,650g $NaH_2PO_4 \times H_2O$
- 29,025g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
- 3,270g EACA(6-Aminohexansäure)
- 1,000g NaN_3
- ad 5 Liter aqua bidest

5. Ferritin (Fa.Serva) 440 000 Dalton
6. Dextranblau (Fa.Pharmacia) 2 000 000 Dalton

Die Eichläufe wurden einzeln nacheinander jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführt:
je 20 mg Eichsubstanz wurden in 2 ml 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0, gelöst und mittels einer Pumpe auf die Säule aufgetragen. Die Gelfiltration lief unter den in Kapitel 2.3.1. beschriebenen Bedingungen ab. Nach Abschluß der Chromatographie wurden die Fraktionen bis zum Scheitelpunkt des Gipfels gesammelt und das genaue Volumen bestimmt.
Die K_{av}-Werte berechneten sich aus der Gleichung:

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Ve = Elutionsvolumen des Proteins
Vo = Elutionsvolumen von Dextranblau (Ausschlußvolumen)
Vt = gesamtes Gelbettvolumen

2.3.3. Konzentrierung der Eluate

Die unter den Peaks gesammelten Fraktionen (6,5 ml/Fraktion) wurden im Dialysierschlauch (Visking Dialysierschlauch 20/32; Fa.Serva) in ca. 30%igem Polyäthylenglycol 20 000 (Fa.Serva) über Nacht bei 4°C auf 1-3 ml eingeengt. Das so gewonnene Konzentrat wurde in Polystyrolröhrchen übergeführt. Hierbei wurde der Dialysierschlauch mehrmals mit wenig 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0, gewaschen. Bis zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline wurden die Fraktionen bei -40°C gelagert.

2.3.4. Isolierung der Standardsubstanzen

IgM und IgA wurde aus Serum dysgammaglobulinämischer, IgG aus Serum normogammaglobulinämischer Hühner isoliert. Isolierung und Reinigung von IgG, IgM und IgA wurde von Fr. Dr. I. Schranner, am hiesigen Institut, durchgeführt (Schranner et al., 1982). Diese Produkte wurden als Standardsubstanzen verwendet, nachdem eine Reinheitsprüfung mit Hilfe der Zweidimensionalen Immunelektrophorese durchgeführt worden war.

2.4. Methoden zur quantitativen Bestimmung

2.4.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen erfolgte nach der Vorschrift von Bradford (1976). 2,5 ml Reagenz[3)] wurden mit 50 µl Probe versetzt. Nach 15 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm im Photometer (M Qu II; Fa.Zeiss) bestimmt. Der Proteingehalt der Probe konnte aus einer mit bovinem Immunglobulin (Behring-Werke) erstellten Eichkurve abgelesen werden.

2.4.2. Rocket-Immunelektrophorese

Zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline wurde die Rocket-Immunelektrophorese nach Laurell (1966) herangezogen.

---

3) Reagenz:
- 150 mg Coomassieblue G 250 (Fa.Serva)
- 50 ml 95%iges Äthanol
- 50 ml 85%ige Phosphorsäure
- ad 1000 ml aqua bidest

Die Elektrophorese wurde in der Kammer Multiphor 2117 (Fa.LKB) in einem Gel mit monospezifischem Antiserum bei 1-2 V/cm über Nacht (12-16 Stunden) durchgeführt. Als Elektrolyt diente Tris-Barbituratpuffer, pH 8,6[4)], verdünnt mit aqua bidest im Verhältnis 1:4. Die Gelmatrix bestand aus 1%iger Agarose L (m_R=0,02; Fa.LKB) in 1:5 verdünntem Tris-Barbituratpuffer, pH 8,6. Nachdem das Agarose-Puffergemisch bis zum Siedepunkt erhitzt worden war, wurde es im Wasserbad auf 55°C abgekühlt und die entsprechende Menge Antiserum zugesetzt. Auf einer horizontalen Arbeitsplatte wurden je 15 ml der Agarose-Antiserummischung auf 10 x 10 x 0,2 cm Glasplatten gegossen. Die Antiserumkonzentrationen betrugen für:

Anti-γ: 1 µl/cm^2
Anti-µ: 2 µl/cm^2
Anti-α: 7 µl/cm^2

Nach Gelierung wurden, 2,5 cm vom Plattenrand entfernt, 13 Löcher pro Platte mit einer Füllkapazität von je 5 µl gestanzt und unter Verwendung einer Hamilton-Spritze mit Antigenverdünnungslösungen gefüllt.
Nach beendeter Elektrophorese wurden die Platten 30 Minuten in physiologischer NaCl-Lösung gewässert, 2 x 15 Minuten gepresst, im Heißluftstrom getrocknet, sowie fünf Minuten mit Coomassie Brillant Blue G 250

---

4) Tris-Barbituratpuffer, pH 8,6:
- 112,00 g Diäthylbarbitursäure (Fa.Merck)
- 121,50 g Tris (Fa.Merck)
- 2,66 g Calciumlactat (Fa. Merck)
- 3,25 g Natriumacid (Fa.Merck)
- ad 5l aqua bidest

(Fa.Serva) gefärbt[5] und ca. zehn Minuten entfärbt[6].

Nach Trocknung der Platten wurden die Höhen der Präzipitationen im Durchlicht bei untergelegter Millimeterschablone gemessen.
Die Eichkurven zur Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgM und IgA wurden anhand von Standardverdünnungsreihen erstellt. Die Immunglobulinkonzentrationen der Proben konnten dann aus den betreffenden Eichkurven abgelesen werden.

2.5. Bestimmungsmethoden, Charakterisierung und Reinheitsprüfung

2.5.1. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in Modifikation nach Scheidegger (1955) unter den von Bohner (1977) beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

2.5.2. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die Zweidimensionale Immunelektrophorese wurde nach Laurell (1965) mit dem gleichen Gerät und Material - wie in 2.4.2. beschrieben - durchgeführt. Die erste Dimension erfolgte in 1%iger Agarose L in Tris-Barbituratpuffer, pH 8,6, bei 10 V/cm.

---

[5] Färbelösung:
- 450 ml Äthanol 96%ig
- 100 ml Eisessig
- 450 ml aqua bidest
- 5 g Coomassie Brillant Blue

[6] Entfärbelösung:
- 250 ml Äthanol
- 100 ml Eisessig
- 450 ml aqua bidest

Die Trenndauer der Probe (5 µl) ergab sich aus der Ferritinlaufstrecke von 5 cm, welche parallel der Probe verlief. 0,5 cm über der Auftrennungsstrecke der Probe wurde das Gel durch 12 ml 1%iger Agarose L mit mono- bzw. polyvalentem Antiserum ersetzt. Die Antiserumkonzentrationen betrugen für:

Anti-γ: 6,6 µl/cm^2
Anti-µ: 13,0 µl/cm^2
Anti-α: 20,0 µl/cm^2

Die zweite Dimension wurde bei 1-2 V/cm über Nacht (12-16 Stunden) durchgeführt. Anschließend wurden die Platten, wie unter 2.4.2. beschrieben, behandelt.

2.5.3. Gewinnung der Antiseren

Die Antiseren wurden, wie bei Wanke (1982) beschrieben, hergestellt.

2.5.4. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Sachs (1976). Zum Vergleich zweier empirischer Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten wurde der T-Test verwendet.

3. *Ergebnisse*

3.1. Gelfiltration

3.1.1. Molekulargewichtsbestimmung

Es wurden die Elutionsvolumina von sechs Markersubstanzen in getrennten Säulenläufen bestimmt. Die K_{av}-Werte (siehe 2.3.2.) wurden errechnet und über die betreffenden Molekulargewichte der Markersubstanzen aufgetragen (Abb.4)

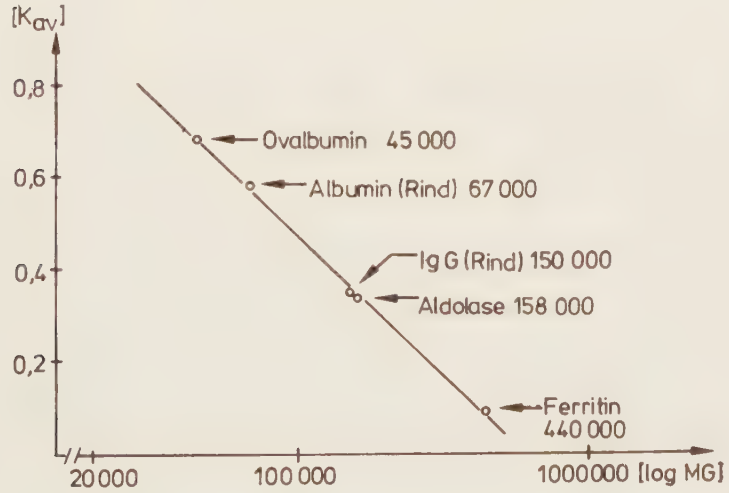

Abb.4: Molekulargewichtsbestimmung der Eichsubstanzen mit der Gelfiltrationsmethode über Ultrogel AcA 34 in 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0 (mit Angabe deren Molekulargewichte).

Genauso wurden von einigen Serumchromatogrammen die Elutionsvolumina bis zum Scheitelpunkt der einzelnen Gipfel bestimmt, die entsprechenden K_{av}-Werte berechnet, und aus der Eichgeraden die betreffenden

Molekulargewichtsbereiche ermittelt.
Die höchsten Konzentrationen von IgG und monomerem IgM wurden in dem Bereich zwischen 160 000 und 180 000 Dalton gemessen, während monomeres IgA aufgrund des höheren Molekulargewichtes etwas schneller eluiert wurde, und zwar zwischen 170 000 und 190 000 Dalton. Die Molekulargewichte von polymerem IgM bzw. IgA konnten mit dieser Methode nicht berrechnet werden, da deren Molekulargewichte außerhalb des effektiven Trennbereichs von Ultrogel AcA 34 liegen und im Ausschlußvolumen der Säule eluiert wurden.

3.1.2. Chromatographie der Serum - Immunglobuline

Die Chromatogramme aller aufgetrennten normogammaglobulinämischen und Kontrollseren zeigten einen ähnlichen Verlauf. Sie wiesen regelmäßig fünf Gipfel auf, wobei die sich einander entsprechenden Gipfel bei verschiedenen Chromatogrammen auch annähernd gleich groß waren (Abb. 5 und 6). Alle dysgammaglobulinämischen Seren zeigten hingegen einen etwas höheren zweiten Gipfel und einen deutlich kleineren Gipfel im 7S-Bereich (Abb.6).

Gemäß den Chromatogrammen wurde derart fraktioniert, daß der Scheitelpunkt eines jeden Gipfels zwischen zwei Schnittstellen lag (erster und letzter Gipfel ausgenommen). Das Tal zwischen dem dritten und vierten Gipfel wurde jeweils an seinem tiefsten Punkt geteilt (Abb. 5 und 6).

Die Fraktionen wurden konzentriert und die Immunglobulinkonzentrationen (IgM,IgA,IgG) jeder einzelnen Fraktion quantitativ bestimmt.

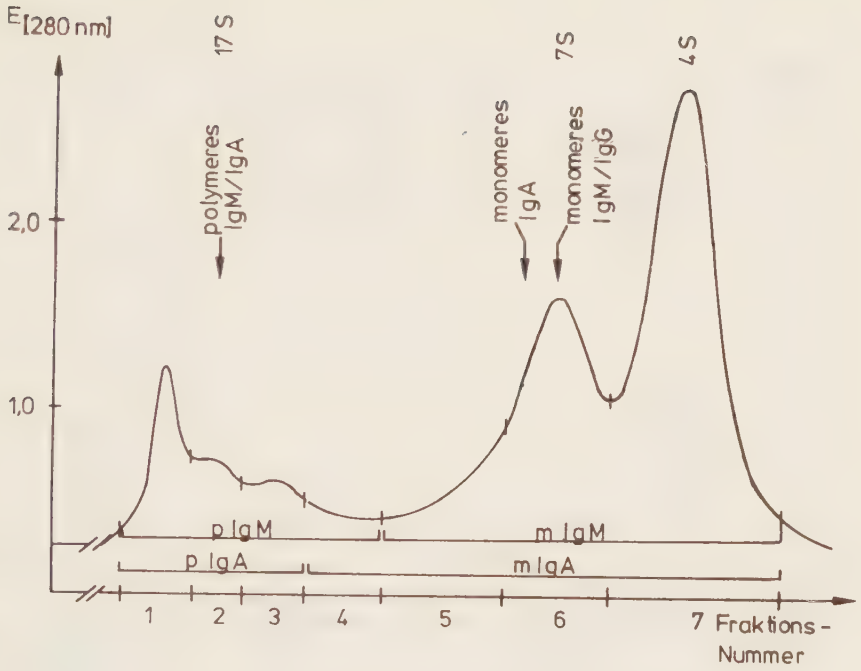

Abb.5: Trennung von Serum eines Kontrollhuhnes über Ultrogel AcA 34 in 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0 (p=polymer; m=monomer).

Die höchsten IgM-Konzentrationen wurden in den Fraktionen zwei und drei (polymeres IgM) bzw. sechs (monomeres IgM) gefunden. Somit wurden die in den Fraktionen eins bis vier gefundenen IgM-Konzentrationen als polymeres IgM, die in den Fraktionen fünf bis sieben als monomeres IgM definiert.

Die höchsten IgA-Konzentrationen wurden bei allen Säulenläufen in den Fraktionen zwei bis drei (polymeres IgA) bzw. fünf und sechs (monomeres IgA) gefunden. Da Fraktion fünf regelmäßig mehr IgA als Fraktion drei enthielt, wurde folgendermaßen definiert:

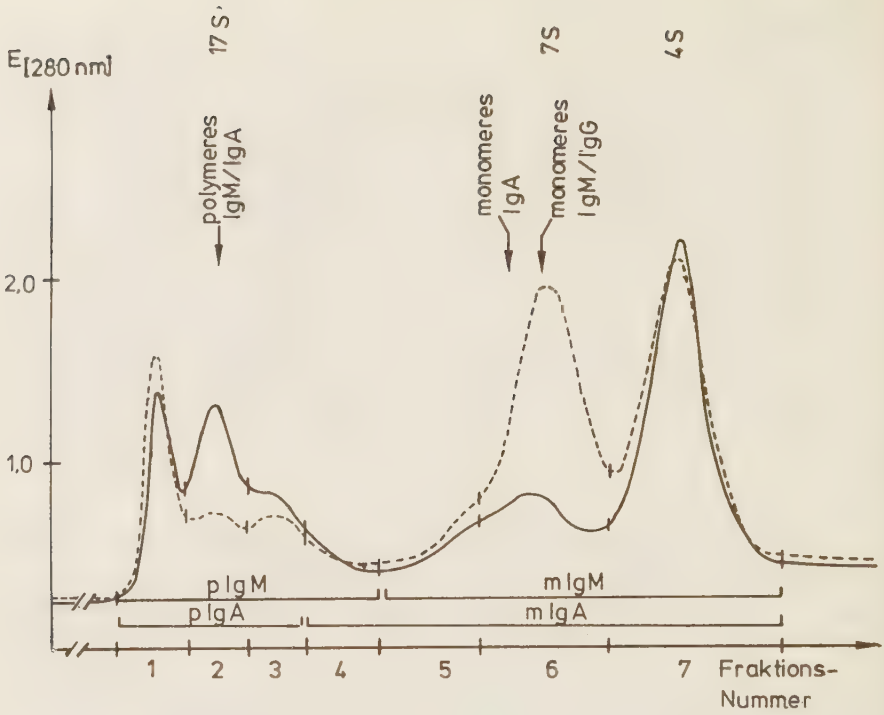

Abb.6: Trennung von Serum eines normogammaglobulinämischen (---) und dysgammaglobulinämischen (——) Huhnes der UM-B19-Linie über Ultrogel AcA 34 in 0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0. (p=polymer; m=monomer).

1. polymeres IgA: die Summe der Konzentrationen aus den Fraktionen eins bis drei
2. monomeres IgA: die Summe der Konzentrationen aus den Fraktionen vier bis sieben.

3.2. Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde bovines Immunglobulin verwendet. Dieses wurde in verschiedenen Konzentrationen gegen die Extinktion bei 595 nm aufgetragen (Abb.7).

Mit Hilfe dieser Eichkurve wurden die Immunglobulinkonzentrationen der Standardsubstanzen ermittelt.

Die Standardsubstanzen enthielten folgende Proteinkonzentrationen:

IgA-Standard: 0,47 mg/ml
IgM-Standard: 0,69 mg/ml
IgG-Standard: 27,00 mg/ml

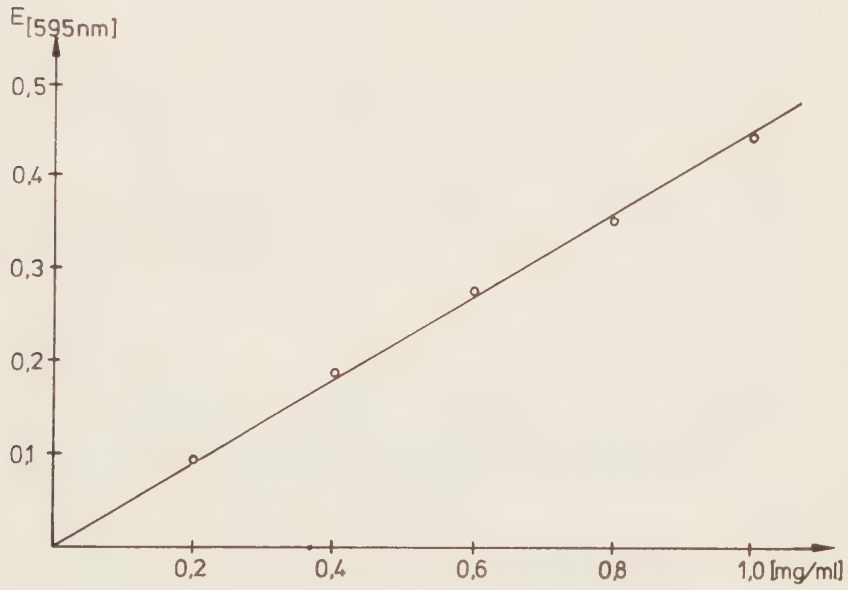

Abb.7: Abhängigkeit der Extinktion von der bovinen Immunglobulinkonzentration.

3.3. Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen

Zur quantitativen Bestimmung der Immunglobuline diente die Methode der Rocket-Immunelektrophorese. Die quan-

titative Auswertung erfolgte durch Ausmessen der Präzipitationshöhen und anschließendem Vergleich mit Eichkurven. Hierfür wurden verschiedene Standardverdünnungen gegen ihre Präzipitationshöhen aufgetragen (Abb.8./9./10.).

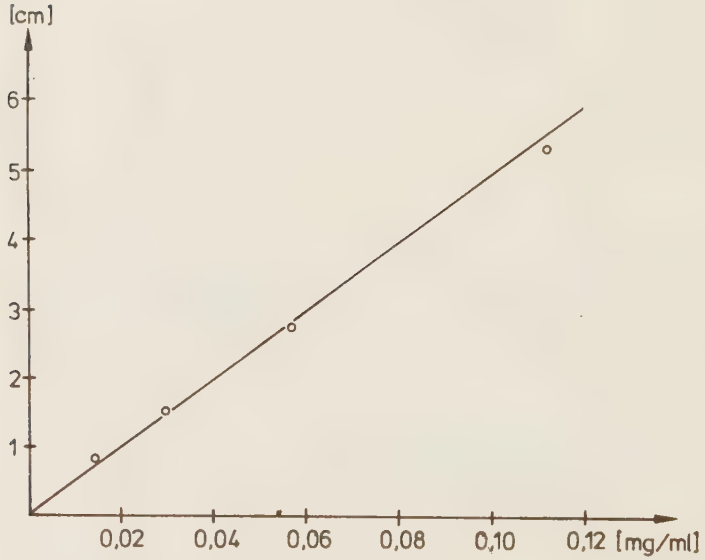

Abb.8: Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgA-Konzentration in der Rocket-Immunelektrophorese

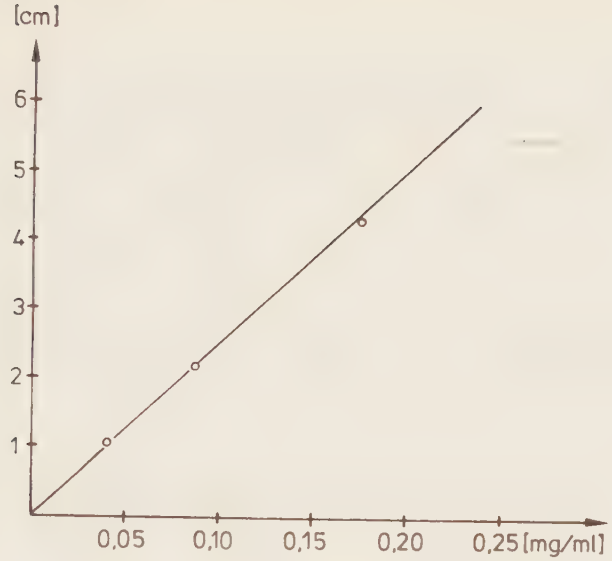

Abb.9: Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgM-Konzentration in der Rocket-Immunelektrophorese.

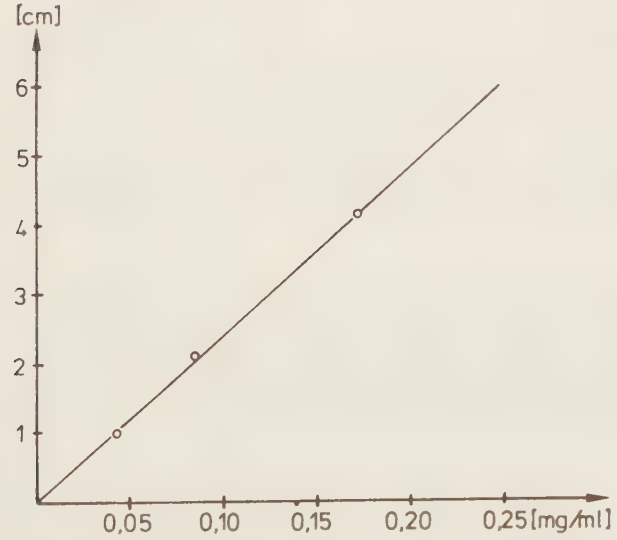

Abb.10: Abhängigkeit der Präzipitationshöhe von der IgG-Konzentration in der Rocket-Immunelektrophorese.

Die Berechnung der - nach Säulentrennung, Fraktionierung und Konzentrierung - wiedergefundenen Immunglobuline wurde folgendermaßen durchgeführt:
Das Volumen jeder Fraktion wurde nach Konzentrierung bestimmt und mit der in der Rocket-Immunelektrophorese ermittelten Konzentration multipliziert. Der so errechnete Gesamtimmunglobulininhalt jeder Fraktion wurde anschließend durch die aufgetragene Serummenge (2 ml) dividiert und somit auf 1 ml Serum bezogen.

Fraktion Nr.	Volumen ml	IgM-Konz. mg/ml	IgM-Gesamt mg	IgM-Gesamt mg/ml Ausgangsserum
1	2,0	0,09	0,18	0,09
2	1,9	0,70	1,33	0,67
3	3,0	0,22	0,66	0,33
4	1,9	0,09	0,17	0,09
5	1,7	0,15	0,26	0,13
6	3,0	0,12	0,36	0,18
7	2,9	0,07	0,20	0,10
				1,59

Tab.3: Tabellarische Darstellung der Berechnung der IgM-Gesamtkonzentrationen eines normogammaglobulinämischen Serums nach Säulentrennung, Fraktionierung und Konzentrierung.

3.4. Bestimmung der Polymeren -und Monomerenkonzentrationen von IgM und IgA bei UM-B19 Hühnern und Kontrollhühnern

Die hier angegebenen Gesamt-Immunglobulinkonzentrationen sind als Summe der - nach Säulentrennung und Konzentrierung der Eluate bestimmten - polymeren und monomeren Untereinheiten zu verstehen. Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline im Gesamtserum ergibt höhere Werte; siehe hierzu auch 3.6.

3.4.1.IgM bei zwei Monate alten Hühnern

Im Serum weisen dysgammaglobulinämische Tiere einen drei- bis vierfach höheren IgM-Gesamtspiegel gegenüber normogammaglobulinämischen Tieren und den Kontrolltieren auf (Abb.11).
Ähnliche Verhältnisse spiegeln sich beim Vergleich der Monomerenkonzentrationen wieder. Bezogen auf die IgM-Gesamtkonzentration weisen aber dysgammaglobulinämische Tiere um 7% weniger 7S-IgM in ihrem Serum auf als die beiden anderen Tiergruppen (Abb.11).

3.4.2.IgM bei vier Monate alten Hühnern

Bei allen drei Tiergruppen steigen die IgM-Gesamtkonzentrationen vom zweiten zum vierten Lebensmonat um ca. 20% bis 50% an. Die größte Steigerung weisen jeweils die weiblichen Tiere auf, die nun in allen drei Tiergruppen etwas höhere IgM-Konzentrationen zeigen als die männlichen Tiere (Abb.12).

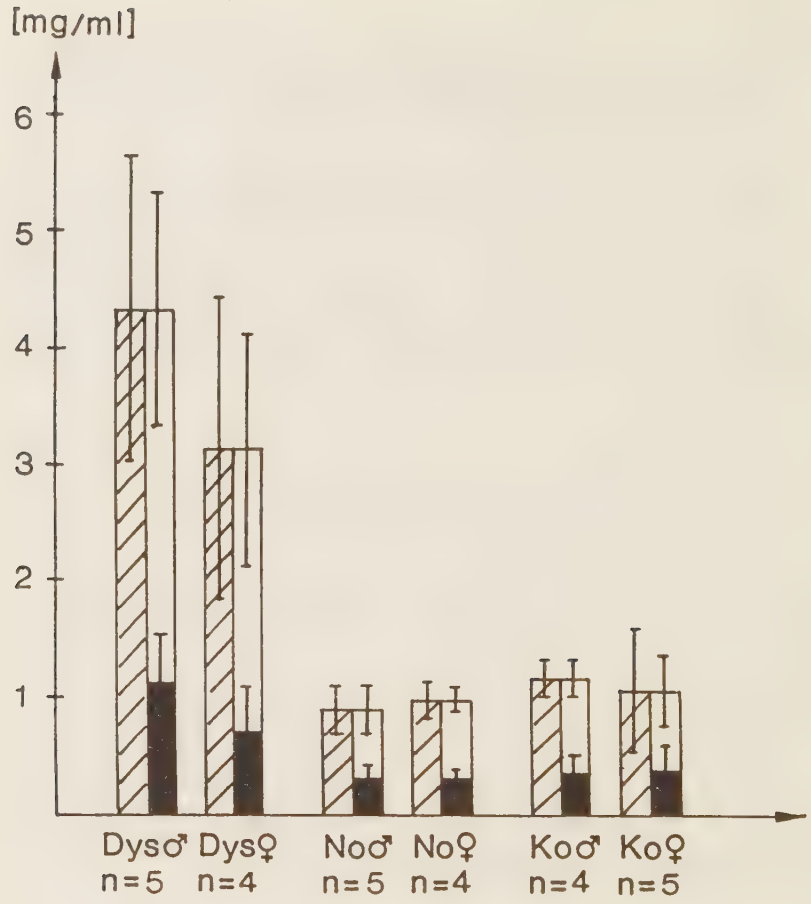

Abb.11: Serum-IgM-Konzentration (mg/ml) zwei Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

▨ = IgM-Gesamt ▯ = IgM-Polymere ■ = IgM-Monomere

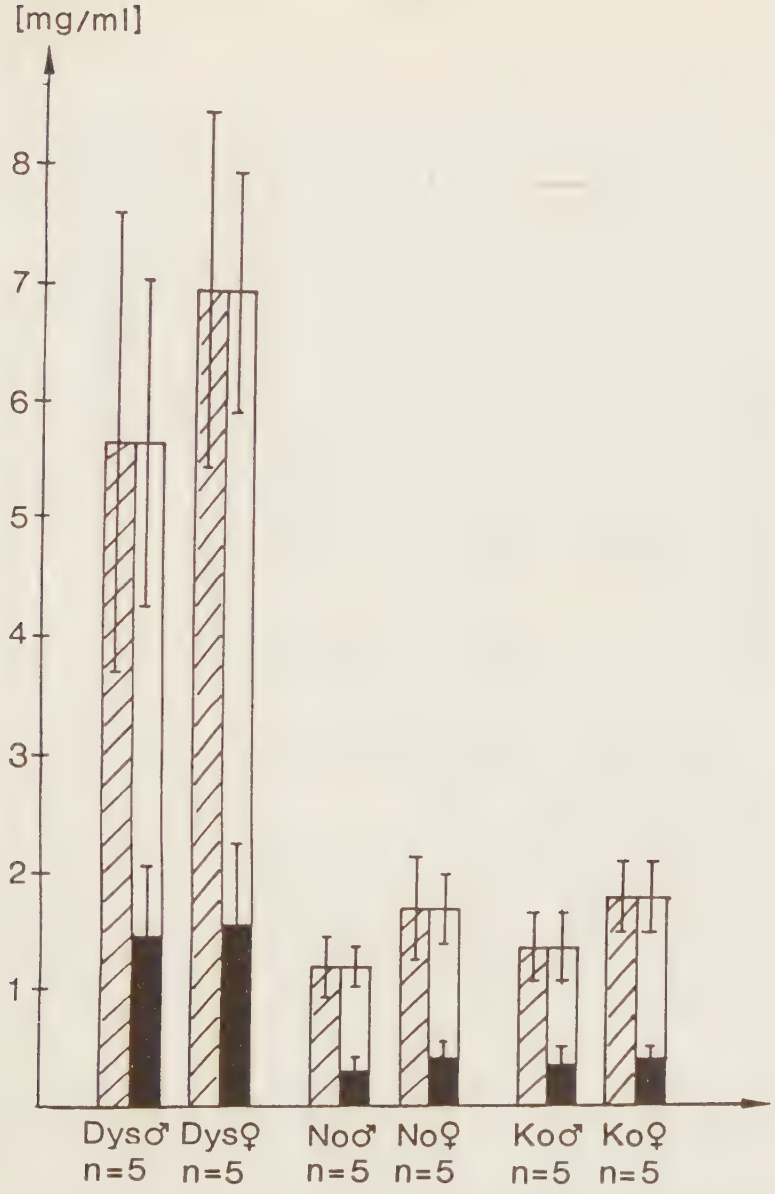

Abb.12: Serum-IgM-Konzentration (mg/ml) vier Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

=IgM-Gesamt =IgM-Polymere =IgM-Monomere

Im Vergleich zur Altersgruppe von zwei Monaten (Abb.11) steigen bei dysgammaglobulinämischen Tieren sowohl die IgM-Gesamtkonzentrationen als auch deren absoluter Monomerenanteil vom Drei- bis Vierfachen auf das Vier- bis Fünffache gegenüber den Werten der normogammaglobulinämischen Tiere und gegenüber denen der Kontrolltiere.
Bei den beiden zuletzt genannten Tiergruppen steigen aber im Vergleich zum Gesamt-IgM die Monomeren nur gering an. Damit fällt bei diesen Tieren der prozentuale Monomerenanteil um ca. 9% auf ca. 23% ab und entspricht dem der dysgammaglobulinämischen Tiere.

3.4.3. IgM bei sechs Monate alten Hühnern

Die IgM-Gesamtkonzentrationen zeigen zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat keine eindeutigen Veränderungen (Abb.13).
Dies gilt auch für die Monomerenkonzentrationen bei normogammaglobulinämischen Tieren und Kontrolltieren.

Der prozentuale Monomerenanteil im Serum dysgammaglobulinämischer Tiere sinkt jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen um ca. 8% auf 16% ab.

Die sich im vierten Lebensmonat andeutenden Geschlechtsunterschiede bezüglich der IgM-Gesamtkonzentrationen manifestieren sich bei den Kontrolltieren zugunsten der weiblichen Tiere, während sie sich bei den normogammaglobulinämischen Tieren umkehren.

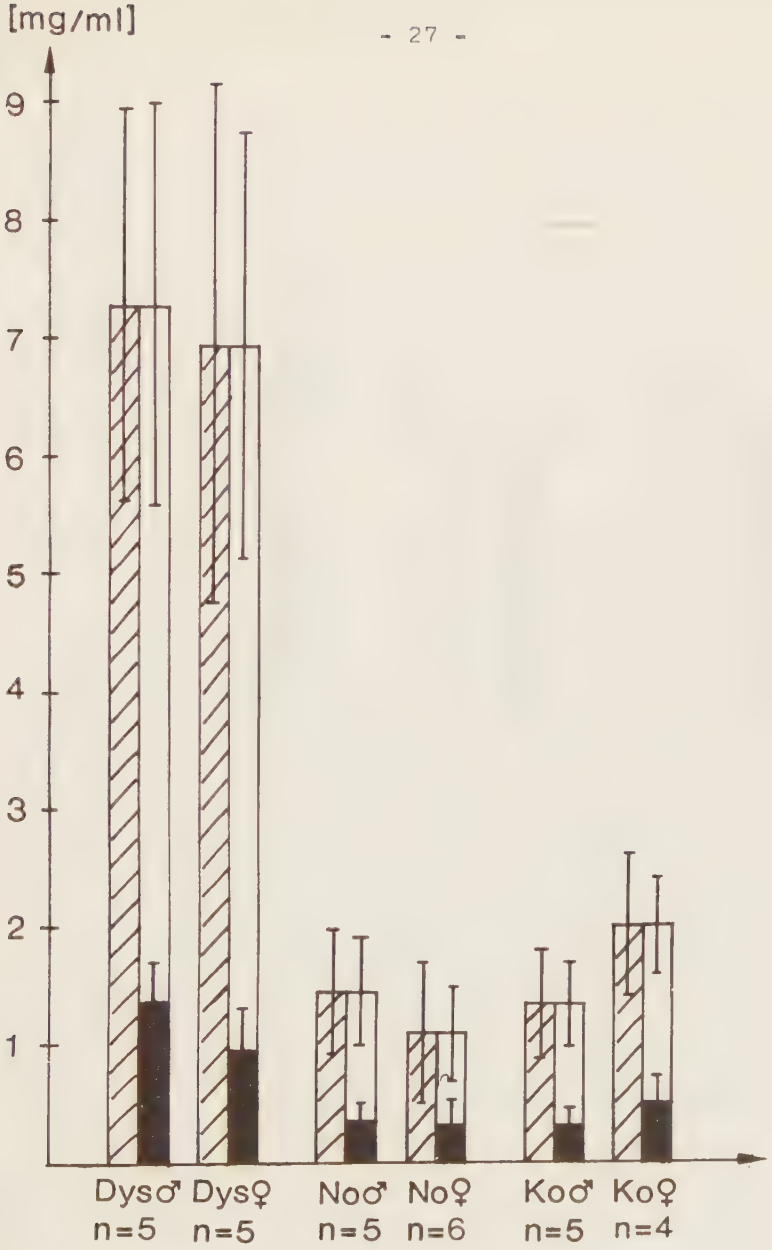

Abb.13: Serum-IgM-Konzentration (mg/ml) sechs Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

=IgM-Gesamt =IgM-Polymere =IgM-Monomere

3.4.4. Monomeres IgM -ein Vergleich der drei Altersgruppen

Für den Vergleich der drei Altersgruppen von zwei, vier und sechs Monaten wurde der prozentuale Anteil des 7S-IgM am Gesamt-IgM errechnet. Da diesbezüglich keine Geschlechtsunterschiede erkennbar waren, konnten männliche und weibliche Tiere zusammengefaßt werden (Abb.14).
Der relative Monomerenanteil am Gesamt-IgM fällt bei allen drei Tiergruppen bis zum sechsten Lebensmonat um 8% bis 10%, jedoch zu verschiedenen Zeiten.
Bei normogammaglobulinämischen Tieren, wie auch bei Kontrolltieren, verringert sich der relative Monomerenanteil vom zweiten zum vierten Lebensmonat, obwohl die IgM-Gesamtkonzentrationen gleichzeitig leicht ansteigen. Zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat ändern sich bei diesen beiden Tiergruppen weder die IgM-Gesamtkonzentrationen, noch der prozentuale Anteil der Monomere.
Bei dysgammaglobulinämischen Tieren bleibt der prozentuale Monomerenanteil im zweiten und vierten Lebensmonat, bei ebenfalls ansteigendem Gesamt-IgM, konstant und fällt erst zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat ab. In diesem Zeitraum verändert sich die IgM-Gesamtkonzentration nicht mehr.

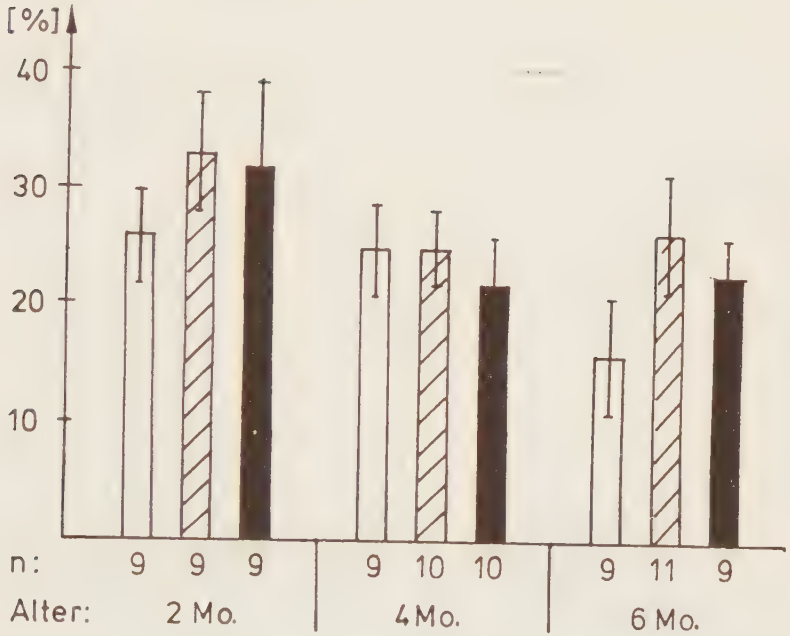

Abb.14: Prozentualer Anteil des monomeren IgM am Gesamt-IgM bei dysgammaglobulinämischen (□) und normogammaglobulinämischen (▨) UM-B19 Hühnern, sowie bei Kontrolltieren (■); im Vergleich zwischen drei Altersstufen.

3.4.5. IgA bei zwei Monate alten Hühnern

Die IgA-Gesamtkonzentrationen liegen - mit Ausnahme der männlichen dysgammaglobulinämischen Tiere, welche höhere Werte aufweisen - zwischen 0,28 und 0,33 mg/ml Serum (Abb.15).
Die Betrachtung der Monomerenkonzentrationen zeigt, daß normogammaglobulinämische Tiere etwas unter dem Niveau der Kontrollen liegen, während dysgammaglobulinämische Tiere,trotz höherer Gesamt-IgA-Spiegel, gleiche Konzentrationen wie die Kontrollen aufweisen.

Errechnete man den prozentualen Anteil des 7S-IgA am Gesamt-IgA, so zeigt sich, daß dysgammaglobulinämische Tiere mit einem Anteil von ca. 40% deutlich unter dem der Kontrollen mit ca. 57% liegen. Normogammaglobulinämische Tiere nehmen diesbezüglich eine Zwischenstellung ein.

3.4.6. IgA bei vier Monate alten Hühnern

Die IgA-Gesamtkonzentrationen sinken vom zweiten zum vierten Lebensmonat bei allen drei Tiergruppen, mit Ausnahme der weiblichen Kontrollen, um durchschnittlich 0,1 mg/ml Serum ab (Abb.16).
Erstaunlicherweise bleiben die absoluten Monomerenkonzentrationen vom zweiten zum vierten Lebensmonat konstant; mit Ausnahme der weiblichen Kontrolltiere. Bei diesen steigen die Monomere proportional zum Gesamt-IgA an.

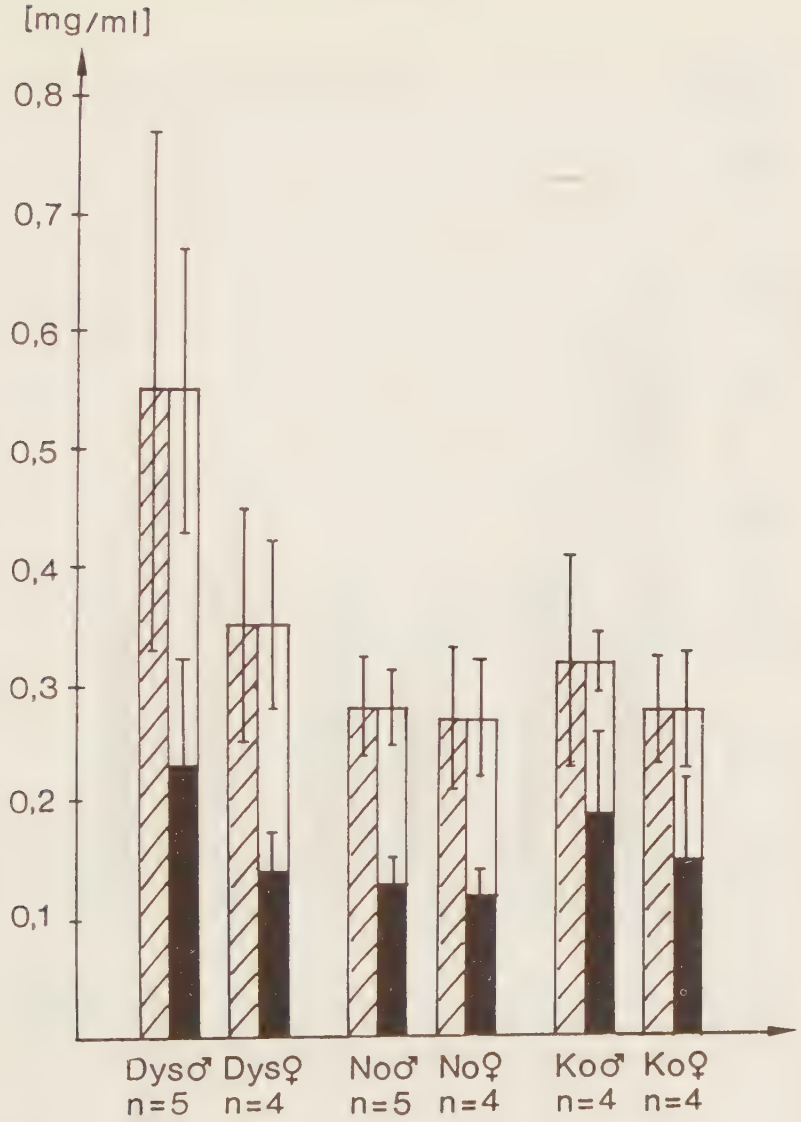

Abb.15: Serum-IgA-Konzentration (mg/ml) zwei Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

=IgA-Gesamt =IgA-Polymere =IgA-Monomere

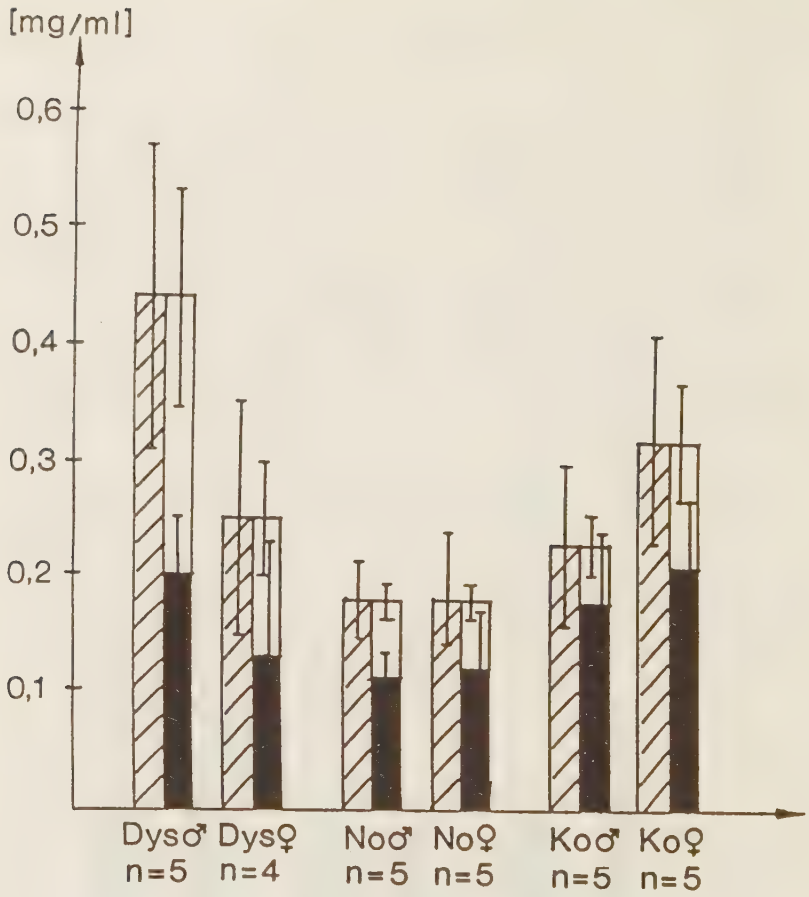

Abb.16: Serum-IgA-Konzentration (mg/ml) vier Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

=IgA-Gesamt =IgA-Polymere =IgA-Monomere

Das Absinken der IgA-Gesamtkonzentration vom zweiten zum vierten Lebensmonat ist eine Folge des verringerten Anteil an polymerem IgA. Der prozentuale Anteil der Monomere am Gesamt-IgA steigt deshalb vom zweiten zum vierten Lebensmonat an.
Wie schon in der Altersgruppe von zwei Monaten, weisen auch mit vier Monaten die dysgammaglobulinämischen Tiere prozentual weniger 7S-IgA in ihrem Serum auf als normogammaglobulinämische Tiere und Kontrollen.

3.4.7. IgA bei sechs Monate alten Hühnern

Die IgA-Gesamtkonzentrationen sinken bei allen drei Tiergruppen - wie schon vom zweiten zum vierten - so auch vom vierten zum sechsten Lebensmonat (Abb. 17).

Das Absinken verlangsamt sich jedoch und beträgt durchschnittlich nur noch 0,05 mg/ml (0,1 mg/ml vom zweiten zum vierten Lebensmonat).
Eine Ausnahme bilden die weiblichen dysgammaglobulinämischen Tiere, die gleiche Durchschnittswerte wie im vierten Lebensmonat zeigen.
Vom vierten zum sechsten Lebensmonat vermindern sich sowohl die Polymeren- als auch die Monomerenkonzentrationen. Somit bleibt der prozentuale Anteil der Monomere gleich dem der Altersgruppe von vier Monaten.

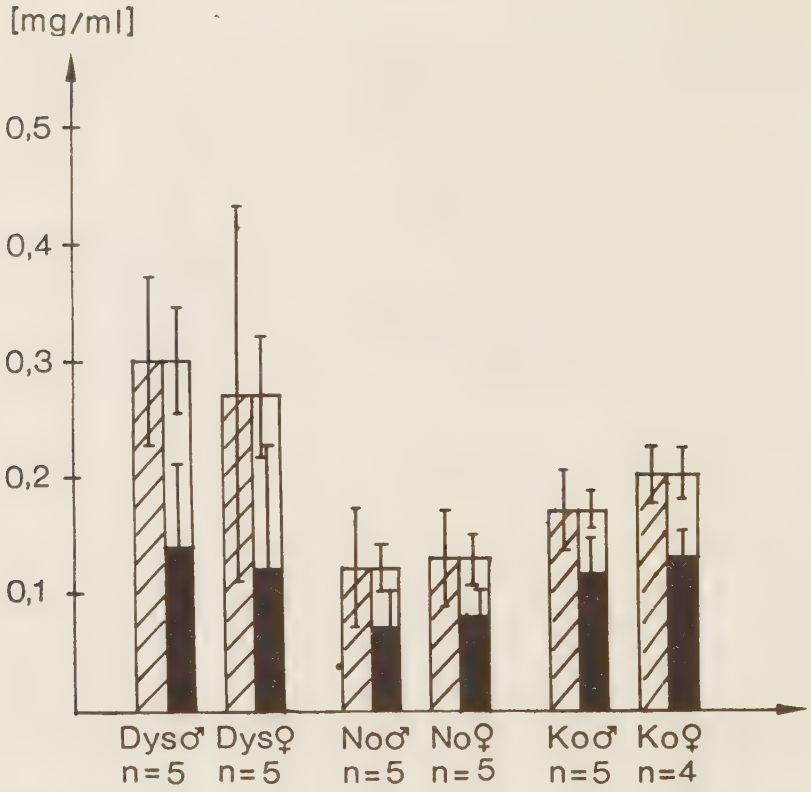

Abb.17: Serum-IgA-Konzentration (mg/ml) sechs Monate alter dysgammaglobulinämischer (Dys) und normogammaglobulinämischer (No) UM-B19 Hühner im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko).

3.4.8. Monomeres IgA - ein Vergleich der drei Altersgruppen

Für den Vergleich der drei Altersgruppen von zwei, vier und sechs Monaten wurde der prozentuale Anteil von 7S-IgA am Gesamt-IgA errechnet. Da diesbezüglich keine Geschlechtsunterschiede erkennbar waren, konnten männliche und weibliche Tiere zusammengefaßt werden (Abb.18).
Obwohl die Gesamt-IgA-Konzentrationen vom zweiten zum vierten Lebensmonat absinken, steigen die prozentualen Monomerenanteile deutlich an. Dies ist auf die Abnahme der Polymere zurückzuführen. Vom vierten zum sechsten Lebensmonat fällt der Gesamt-IgA-Spiegel, wenn auch verlangsamt, weiter. Da nun auch die Monomerenkonzentrationen bei allen Altersgruppen sinken, bleiben die prozentualen Monomerenanteile relativ konstant.
In allen drei Altersgruppen weisen die Kontrolltiere den relativ höchsten Monomerenanteil auf. Die normogammaglobulinämischen Tiere passen sich mit zunehmendem Alter den Kontrollen an.
Dysgammaglobulinämische Tiere zeigen in allen drei Altersgruppen einen deutlich geringeren prozentualen Monomerengehalt. Bemerkenswert ist die ab dem vierten Lebensmonat außerordentlich zunehmende Streuung der Meßwerte bei dysgammaglobulinämischen Tieren. Bei diesen treten im sechsten Lebensmonat Einzelwerte zwischen 6% und 60% auf.

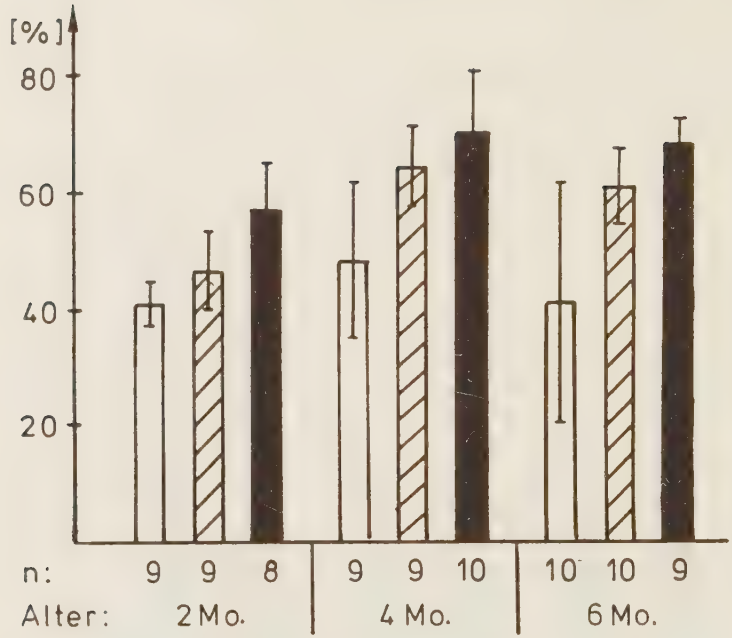

Abb.18: Prozentualer Anteil des monomeren IgA am Gesamt-IgA bei dysgammaglobulinämischen (□) und normogammaglobulinämischen (▨) UM-819 Hühnern, sowie bei Kontrolltieren (■); im Vergleich zwischen drei Altersstufen.

3.5. Einfluß von Geschlecht und Alter auf die Serum-Immunglobulinkonzentrationen bei UM-B19 Hühnern und Kontrollhühnern

Die im folgenden Abschnitt angegebenen Immunglobulinkonzentrationen wurden - im Gegensatz zu 3.4. - im Gesamtserum bestimmt.

3.5.1. Immunglobulin M

Dysgammaglobulinämische Hühner weisen gegenüber Kontrollhühnern je nach Altersgruppe zwei- bis fünffach höhere IgM-Serumkonzentrationen auf.
Während bei beiden Geschlechtern vom zweiten zum vierten Lebensmonat ein Anstieg der IgM-Serumspiegel um fast 50% feststellbar ist, verändern sich die Immunglobulinkonzentrationen vom vierten zum sechsten Lebensmonat kaum mehr.
In allen drei Altersgruppen liegen die Werte der männlichen geringfügig über denen der weiblichen Tiere (Tab.4).

Normogammaglobulinämische Hühner weisen vom zweiten bis zum sechsten Lebensmonat eine leicht steigende Tendenz ihrer IgM-Serumkonzentrationen auf. Dieser Anstieg verläuft bei den männlichen Tieren stetig, bei den weiblichen aber diskontinuierlich mit einem Gipfel im vierten Lebensmonat.
Eindeutige Geschlechtsunterschiede sind nicht erkennbar (Tab.4).

Die Kontrollhühner (Ko_1) beider Geschlechter besitzen im Alter von zwei Monaten annähernd gleiche IgM-Serumkonzentrationen. Während die IgM-Spiegel der weiblichen Tiere bis zum sechsten Lebensmonat um fast 80% ansteigen, bleiben die männlichen Tiere in diesem Zeit-

raum auf annähernd gleichem Niveau (Abb.19).

Die Untersuchung von je 12 sechs Monate alten männlichen und weiblichen Hühnern der White-Rock-Linie (Ko_2) zeigte, daß bei erwachsenen, genetisch intakten Hühnern die weiblichen Tiere signifikant ($p<0,001$) höhere IgM-Serumkonzentrationen gegenüber den männlichen Tieren aufweisen (Tab.4).

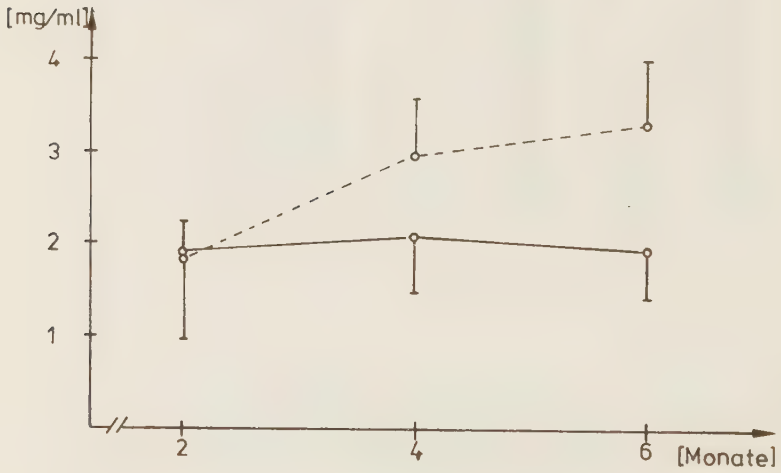

Abb.19: Abhängigkeit der IgM-Serumkonzentrationen von Geschlecht und Alter bei Kontrolltieren.
----=weiblich ———=männlich

Tier Gruppe	Geschlecht	Alter 2 Monate	4 Monate	6 Monate
Dys	♀	5,07±1,54 n = 4	9,70±2,58 n = 4	8,30±2,29 n = 11
	♂	6,01±1,45 n = 5	10,12±3,13 n = 5	9,11±1,55 n = 12
Normo	♀	1,44±0,19 n = 4	2,45±0,72 n = 5	1,65±0,85 n = 6
	♂	1,41±0,16 n = 5	1,72±0,30 n = 5	1,94±0,52 n = 5
Ko_1	♀	1,86±0,91 n = 5	2,89±0,59 n = 5	3,30±0,58 n = 4
	♂	1,89±0,15 n = 4	2,08±0,57 n = 5	1,96±0,50 n = 5
Ko_2	♀	-----	-----	2,75±0,34 n = 12
	♂	-----	-----	1,90±0,33 * n = 12

Tab.4: Abhängigkeit der IgM-Serumkonzentrationen in mg/ml Serum von Geschlecht und Alter bei dysgammaglobulinämischen (Dys) und normogammaglobulinämischen (Normo) UM-B19 Hühnern und bei Kontrollhühnern (Ko_1: Hühner der HNL-Linie; Ko_2: Hühner der White-Rock-Linie).
** $p<0,001$
* $p>0.5$

3.5.2. Immunglobulin A

Dysgammaglobulinämische Hühner besitzen in allen drei Altersgruppen ein- bis zweifach höhere IgA-Serumkonzentrationen als Kontrollhühner. Vom zweiten bis zum sechsten Lebensmonat sinken die IgA-Spiegel bei beiden Geschlechtern um fast 50%. In allen drei Altersgruppen sind bei den männlichen höhere IgA-Konzentrationen feststellbar, als bei den weiblichen Tieren (Tab.5). Die sich andeutenden Geschlechtsunterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Bei normogammaglobulinämischen Hühnern sinken die IgA-Serumkonzentrationen vom zweiten bis zum sechsten Lebensmonat sogar um mehr als 50%. Geschlechtsunterschiede sind in keiner Altersgruppe feststellbar (Tab.5).

Auch bei den Kontrollhühnern (Ko_1) ist eine Abnahme der IgA-Spiegel bis zum sechsten Lebensmonat zu beobachten. Von gleichen Serumkonzentrationen,im zweiten Lebensmonat ausgehend, zeigen die männlichen jedoch eine stärker fallende Tendenz als die weiblichen Tiere.

Ebenso wurden bei je 12 sechs Monate alten männlichen und weiblichen Hühnern der White-Rock-Linie (Ko_2) die IgA-Serumkonzentrationen bestimmt. Die sich andeutenden Geschlechtsunterschiede konnten statistisch nicht gesichert werden ($p>0,5$).

Tier Gruppe	Geschlecht	Alter 2 Monate	4 Monate	6 Monate
Dys	♀	0,54±0,14 n = 4	0,36±0,11 n = 4	0,38±0,07 * n = 10
	♂	0,76±0,30 n = 5	0,62±0,18 n = 5	0,36±0,04 * n = 12
Normo	♀	0,38±0,03 n = 4	0,23±0,08 n = 5	0,15±0,03 n = 5
	♂	0,36±0,04 n = 5	0,22±0,04 n = 5	0,15±0,06 n = 5
Ko_1	♀	0,39±0,08 n = 4	0,38±0,09 n = 5	0,24±0,02 n = 4
	♂	0,39±0,08 n = 4	0,32±0,07 n = 5	0,20±0,04 n = 5
Ko_2	♀	-----	-----	0,20±0,03 * n = 12
	♂	-----	-----	0,18±0,04 * n = 12

Tab.5: Abhängigkeit der IgA-Serumkonzentrationen in mg/ml Serum von Geschlecht und Alter bei dysgammaglobulinämischen (Dys) und normogammaglobulinämischen (Normo) UM-B19 Hühnern und bei Kontrollhühnern (Ko_1: Hühner der HNL-Linie; Ko_2: Hühner der White-Rock-Linie).
* $p>0,5$

3.5.3. Immunglobulin G

Aufgrund der niedrigen IgG-Konzentrationen kann für dysgammaglobulinämische Tiere keine Aussage getroffen werden.

Die IgG-Serumspiegel bei normogammaglobulinämischen- und Kontrollhühnern (Ko_1) steigen vom zweiten bis zum sechsten Lebensmonat an. Weibliche Tiere zeigen insbesondere zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat eine steigende Tendenz, während männliche Tiere, unter Berücksichtigung ihrer Standardabweichung, kaum Veränderungen aufweisen.

Geschlechtunterschiede sind bei keiner der drei untersuchten Tiergruppen feststellbar (Tab.6).

3.6. Serum-Immunglobulinkonzentrationen vor und nach Säulentrennung

Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgM, IgA und IgG jedes einzelnen Serums erfolgte mit zwei Methoden:

1. Die Konzentrationen wurden im Gesamtserum bestimmt.
2. Die Konzentrationen wurden nach Säulentrennung als Summe aller Fraktionen ermittelt.

Die zweite Methode war, insbesondere durch die der quantitativen Auswertung vorgeschaltene Konzentrierung der Eluate, mit Verlusten verbunden. Über deren Höhe gibt die Wiederfindungsrate Auskunft. Diese drückt den prozentualen Anteil der nach Säulentrennung gefundenen Werte, bezogen auf die Konzentrationen im Gesamtserum, aus. Die Wiederfindungsrate wurde für jede

Tier Gruppe	Geschlecht	Alter 2 Monate	4 Monate	6 Monate
Dys	♀	<0,02 n = 4	<0,04 n = 4	<0,02 n = 5
	♂	<0,05 n = 5	<0,08 n = 5	<0,02 n = 5
Normo	♀	5,99±0,95 n = 4	7,13±1,26 n = 5	7,00±1,54 n = 5
	♂	5,55±0,55 n = 5	6,33±1,33 n = 5	6,20±1,22 n = 5
Ko_1	♀	4,21±1,49 n = 5	6,78±0,97 n = 5	5,53±1,15 n = 4
	♂	4,59±1,07 n = 4	5,10±1,51 n = 5	4,84±0,89 n = 5
Ko_2	♀	-----	-----	4,36±1,02 * n = 12
	♂	-----	-----	4,81±0,97 * n = 12

Tab.6: Abhängigkeit der IgG-Serumkonzentrationen in mg/ml Serum von Geschlecht und Alter bei dysgammaglobulinämischen (Dys) und normogammaglobulinämischen (Normo) UM-B19 Hühnern und bei Kontrollhühnern (Ko_1: Hühner der HNL-Linie; Ko_2: Hühner der White-Rock-Linie).
* $p>0.5$

Serumprobe gesondert berechnet und betrug durchschnittlich für:
IgM: 66% (Anteil der Monomere: 20-30%)
IgA: 78% (Anteil der Monomere: 40-60%)
IgG: 86% (Anteil der Monomere: 100%)
Auffallend ist die Beziehung der verschiedenen Wiederfindungsraten der drei Immunglobulinklassen zu deren Anteil an Monomeren. Die Wiederfindungsrate scheint mit dem Anteil der Monomere einer Immunglobulinklasse positiv korreliert zu sein.

4. *Diskussion*

4.1. Besprechung der Methoden

Keine andere Proteinfamilie eines höher entwickelten Individuums zeigt einen so großen Strukturpolymorphismus wie die Immunglobuline (Nisonoff et al.,1975). Dennoch liegt den Antikörpern aller Wirbeltiere ein einheitliches Bauprinzip zugrunde. Die kleinste funktionelle Struktureinheit besteht aus je zwei H-und L-Ketten und wird als Monomer bezeichnet. Die Immunglobuline M und A treten im Organismus aber auch als polymere Antikörper auf. Da diese aus zwei oder mehreren monomeren Untereinheiten bestehen, werden sie als Polymere den monomeren Strukturen gegenübergestellt. Monomere und Polymere besitzen gegenüber einem betreffenden Antigen gleiche Spezifität und Antigenität (Jones, 1970; Spengler and Weber, 1980). Deshalb läßt eine quantitative Bestimmung der Immunglobuline M und A im Gesamtserum nur eine Aussage über IgM- bzw IgA-Gesamtspiegel zu.

Will man die im Serum vorhandenen monomeren und polymeren Strukturen quantitativ differenzieren, so muß der quantitativen Bestimmung ein Trennvorgang vorausgehen. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Gelfiltration über Ultrogel AcA 34 durchgeführt. Dieses Trennmedium zeigt gegenüber dem weitverbreiteten Sephadex G-200 nicht nur für humanes Serum (Jefferies, 1976), sondern auch für aviäres Serum bessere Trenneigenschaften (Bohner,1977; Schranner et al., 1982). Um eine gute Trennung des monomeren IgA bzw. IgM von den Polymeren zu ermöglichen, wurde Ultrogel

AcA 34 (Acrylamid: Agarose=3:4) verwendet, das einen optimalen Trennbereich von 25 000 bis 350 000 Dalton besitzt; denn 7S-IgA und 7S-IgM werden zwischen 160 000 und 190 000 Dalton eluiert (Leslie and Martin, 1973), während die polymeren Immunglobuline Molekulargewichte von über 360 000 Dalton aufweisen (Bienenstock et al., 1973; Leslie and Martin, 1973; Kobayashi and Hirai, 1980).

Dem Laufpuffer (0,035 M Phosphatpuffer, pH 8,0) wurde zur Unterdrückung einer bakteriellen Besiedelung 0,02% Natriumacid (NaN_3) beigemischt. Um eine mögliche Degradierung der Immunglobuline durch proteolytische Enzyme zu verhindern, wurde dem Serum 6-Aminohexansäure (ε-Aminocapronsäure) in 5-millimolarer Konzentration zugesetzt, ebenso war sie Bestandteil des Laufpuffers (Alkjaersig et al.,1958).

Um die mittels Gelfiltration aufgetrennten monomeren und polymeren Immunglobuline quantitativ zu bestimmen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zu den gebräuchlichsten Methoden zählen die Radiale Immunodiffusion, der Radioimmunassay und die Rocket-Immunelektrophorese.

Die Methode der Radialen Immunodiffusion (Mancini et al., 1965) war im Rahmen dieser Arbeit ungeeignet, weil sie den kleineren monomeren Einheiten einen deutlichen Diffusionsvorteil bietet. Bei gleichen Konzentrationen zeigt 7S-IgM gegenüber 19S-IgM einen 1,5- bis 2-fach größeren Diffusionsdurchmesser (Harisdangkul et al., 1975). Proben von Gesamtserum, welche monomere und polymere Strukturen enthalten, zeigen deshalb zwei Banden (Fey et al., 1976).

Dieses Phänomen führt zu Ungenauigkeiten und gegebenenfalls zur Überschätzung von Serumimmunglobulinkonzentrationen bei Proben mit einem hohen Monomerenanteil (Jones, 1970).

Als quantitative Bestimmungsmethode käme ferner der Radioimmunassay in Betracht (Yalow and Berson, 1960). Ganz allgemein kann jedoch festgestellt werden, daß diese hochempfindliche Methode zwar zur Quantifizierung von sehr geringen Konzentrationen, aber weniger als Routinemethode geeignet ist (Fey et al., 1976). Ferner führen unspezifische Bindungen der radioaktiv gekoppelten Substanzen zu Ungenauigkeiten bei der quantitativen Bestimmung von IgM in Proben mit hohen IgM-Konzentrationen (Fey et al., 1976), die bei dysgammaglobulinämischen Seren regelmäßig vorliegen.

Zur Quantifizierung der verschiedenen Immunglobulinstrukturen wurde deshalb in dieser Arbeit die Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966) gewählt. Diese Methode weist eine hohe Empfindlichkeit auf; die untere Nachweisgrenze beträgt 0,02 mg/ml Serum. Außerdem ist die Rocket-Immunelektrophorese routinemäßig gut durchführbar und für die quantitative Bestimmung von monomeren und polymeren Formen gleichermaßen geeignet. Denn Monomere und Polymere weisen zwar ein unterschiedliches Diffusionsverhalten auf (Harisdangkul et al., 1975), zeigen aber keine Unterschiede bezüglich ihrer elektrophoretischen Mobilität in Agarose (Jaquet et al., 1974; Spengler and Weber, 1980).
Agarose L zeichnet sich durch eine niedrige Endosmose aus. Damit konnte erstens die Wanderung von IgG in Richtung Kathode verhindert und zweitens das Auftragen der Proben unter Spannung vermieden werden.

Die quantitative Auswertung in der Rocket-Immunelektrophorese erfolgte durch Vergleich der betreffenden Präzipitationshöhen mit denjenigen von Standardsubstanzen.

Die Proteinkonzentrationen dieser Reinprodukte wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine Farbstoffbindungsreaktion, welche mit einer sterischen Veränderung im Farbstoffmolekül und einer erhöhten Absorption bei 595 nm einhergeht. Die Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Empfindlichkeit - sie gilt gegenüber der Methode nach Lowry als viermal empfindlicher (Bradford, 1976) und in der geringen Störanfälligkeit gegenüber Begleitsubstanzen und Puffersalzen (Read and Northcote, 1981). Außerdem besitzt diese Methode eine Proteinspezifität, die bereits von Bradford beschrieben und von Read and Northcote (1981) näher untersucht wurde. Immunglobuline weisen geringere Farbintensitäten gegenüber gleichen Konzentrationen von Serumalbuminen auf (Read and Northcote, 1981). Auch andere Autoren (Schnell et al., 1983) sprechen die verschiedene Empfindlichkeit dieser Methode gegenüber Albumin und Gammaglobulinen an. Für diese Arbeit war dies von Vorteil, da die Quantifizierung der Immunglobuline in den Reinsubstanzen auch anhand einer mit Immunglobulinen erstellten Eichkurve vorgenommen werden konnte. Da hochgereinigtes aviäres Immunglobulin nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde bovines Immunglobulin (Behring-Werke) verwendet.

4.2. Besprechung der Ergebnisse

Immunglobulin M:
Das Makroglobulin IgM tritt beim Wirbeltier in der Regel als Polymer (Pentamer) auf. Über das freie Vorkommen von monomerem IgM (7S-IgM), das beim Vorliegen bestimmter Erkrankungen im Humanserum diagnostiziert werden kann, liegen beim Tier nur wenig Erkenntnisse vor. Es wurde im Serum einiger niederer Wirbeltiere, wie z.B. dem Hai und dem Hundsfisch (Marchalonis and Edelman, 1965; Clem and Small, 1967; Small et al., 1970) und im Pferdeserum (Sandor et al., 1964) als physiologisch vorkommend nachgewiesen.

Auch in Seren dysgammaglobulinämischer Hühner der UM-B19-Linie ist das Auftreten von 7S-IgM beschrieben worden (Schranner et al., 1982). In dieser Arbeit konnte 7S-IgM auch im Serum von Hühnern der HNL-Linie und von normogammaglobulinämischen Hühnern der UM-B19-Linie festgestellt werden. Ferner konnte gezeigt werden, daß dysgammaglobulinämische Hühner bei drei-bis vierfach erhöhten IgM-Gesamtkonzentrationen gegenüber Kontrolltieren (HNL-Linie) und normogammaglobulinämischen Hühnern auch ähnlich erhöhte 7S-IgM-Konzentrationen aufweisen. Bei allen drei untersuchten Tiergruppen sinkt der Anteil des 7S-IgM am Gesamt-IgM vom zweiten bis zum sechsten Lebensmonat um 7% bis 10% ab.

Den Herkunftsort dieses monomeren IgM näher zu untersuchen, war unter anderem eine Zielsetzung dieser Arbeit. Die Frage nach der Herkunft wird insbesondere von der Humanmedizin gestellt. Dort kann nämlich 7S-IgM beim Vorliegen bestimmter pathologischer Befunde und auch beim Säugling im Serum gefunden werden

(Perchalski et al., 1968; Hunter et al., 1968). Vier Hypothesen können bezüglich des Ursprunges von 7S-IgM diskutiert werden:

1. 7S-IgM ist das Ergebnis einer in vivo oder in vitro ablaufenden Dissoziation der polymeren Struktur.
2. Es handelt sich um ehemals menbranassoziiertes 7S-IgM, wie es auf kleinen Lymphozyten nachgewiesen wurde (Marchalonis and Cone, 1973; Vitteta et al., 1974).
3. 7S-IgM resultiert aus einer Störung der pentameren Polymerisation in den B-Zellen (Fakunle et al., 1979).
4. 7S-IgM stellt eine eigene Immunglobulinklasse mit noch ungeklärtem zellulärem Herkunftsort dar (Harisdangkul et al., 1975).

Gegen die erste Hypothese sprechen die Ergebnisse von Small et al. (1970) und von Solomon and Mc Laughlin (1970); denn radioaktiv markiertes 19S-IgM erwies sich sowohl in vivo als auch in vitro als außerordentlich stabil.

Die in der zweiten Hypothese gemachte Annahme, es könnte sich bei dem frei im Serum vorkommenden 7S-IgM des Huhnes um ein ehemals zellassoziiertes Immunglobulin handeln, kann verneint werden. Zwar wird das Vorkommen von 7S-IgM auf kleinen Lymphozyten beschrieben, doch beträgt die Produktionsaktivität dieser Zellen nur ein Hundertstel von jener der Plasmazellen (Vitteta et al., 1974). Der in dieser Arbeit errechnete prozentuale Anteil der Monomeren beträgt aber bei allen drei Tiergruppen, je nach Altersgruppe, 15% bis 30% vom Gesamt-IgM.

Der Vergleich zwischen den drei in dieser Arbeit untersuchten Tiergruppen belegt einen Zusammenhang zwischen

den Monomeren- und Polymerenkonzentrationen im Hühnerserum. Dysgammaglobulinämische Hühner weisen bei drei- bis vierfach höheren IgM-Gesamtkonzentrationen gegenüber den normogammaglobulinämischen - und Kontrollhühnern auch annähernd drei- bis vierfach höhere Konzentrationen von 7S-IgM auf. Somit lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Herkunft des 7S-IgM aus Plasmazellen vermuten. (siehe dritte Hypothese).

Diese Vermutung kann mit dem bisher bekannten Wissen über die IgM-Biosynthese des Menschen untermauert werden (Abb. 20).

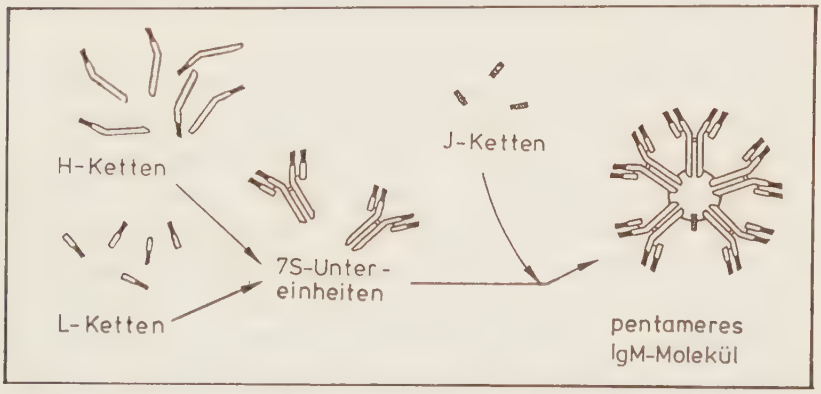

Abb. 20: Schematische Darstellung der intrazellulären IgM-Synthese.

H- und L-Ketten werden intrazellulär über Disulfidbrükken zu 7S-Untereinheiten verbunden. Voraussetzung für eine Polymerisierung dieser Untereinheiten zum Pentamer ist das Vorhandensein von "joining-proteinen", auch J-Ketten genannt, die von Seiten der Zelle gebildet werden müssen (Della Corte and Parkhouse, 1973). Das Eingehen von kovalenten Bindungen zwischen einer J-Kette

und zwei 7S-Untereinheiten zum Oligomer wird als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Pentamerenpolymerisation angesehen (Parkhouse, 1975).
Dieser Schritt ereignet sich kurz vor oder während der IgM-Sekretion. In Abwesenheit von J-Ketten entstehen keine geordneten 19S-Makromoleküle mehr. Es werden hauptsächlich 7S-Untereinheiten als Plasmazellprodukte sezerniert (Parkhouse, 1975).

Da auch aviäres IgM und IgA über ein der J-Kette ähnliches Protein verfügen (Kobayashi and Hirai, 1980), könnte das physiologische Auftreten von 7S-IgM beim Huhn in diesem Zusammenhang gesehen und mit einer verminderten Synthese dieses Strukturproteins erklärt werden. Die prozentuale Abnahme des Anteils von 7S-IgM am Gesamt-IgM zwischen dem zweiten und sechsten Lebensmonat würde dann eine bedingte Anpassung der J-Kettenproduktion an eine erhöhte IgM-Gesamtproduktion bedeuten.

Hinsichtlich der beim Menschen beschriebenen Krankheitsbilder, welche mit dem Auftreten von 7S-IgM-Serum einhergehen können, muß die Frage nach der Herkunft der monomeren Formen sicher differenziert gesehen werden. Denn nicht bei allen Erkrankungen, die mit einer starken Erhöhung des IgM-Serumspiegels verlaufen, tritt 7S-IgM frei im Serum auf (Masseyeff et al.,1972).

Dies ist aber bei einigen Krankheitsbildern der Fall. Hierzu gehören eine bestimmte Form der Primären Leberzirrhose (Fakunle et al., 1979; Taal et al., 1982), das Tropische Splenomegalie Syndrom (Fakunle and Greenwood, 1977) und die Schlafkrankheit (Masseyeff et al., 1972). Bei dem Anteil der Erkrankten, welche eine signi-

fikante Erhöhung ihres IgM-Gesamtspiegels aufweisen, ist damit auch ein Auftreten von 7S-IgM verbunden. Von den betreffenden Autoren wird unter anderem auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß unter bestimmten Bedingungen die Pentamerensynthese nicht mehr mit der stark erhöhten Syntheseleistung der Plasmazelle schritthalten kann. Hierfür spricht auch das Auftreten von leichten Ketten im Serum einiger Patienten, welche am Tropischen Splenomegalie Syndrom bzw. an der Schlafkrankheit erkrankt waren. Diese eben erwähnte und von den oben genannten Autoren diskutierte Vermutung deckt sich mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit; 7S-IgM entstammt den Plasmazellen und tritt bei erhöhter IgM-Produktion vermehrt im Serum auf.

Berichte andere Autoren lassen aber auch die Möglichkeit einer zellulär getrennten Herkunft von 19S-IgM und 7S-IgM zu. So wird das Vorkommen von 7S-IgM bei der Rheumatoiden Arthritis und dem Systemischen Lupus Erythematosus beschrieben (Harisdangkul et al., 1975). Auch hier ist zwar die 7S-IgM-Konzentration mit einem erhöhten IgM-Gesamtspiegel korreliert, aber die Analyse der leichten Ketten erbrachte ein erstaunliches Ergebnis. 7S-IgM von drei der sechs untersuchten Patienten bestand ausschließlich aus λ-Ketten. Ein Vorkommen von nur einem L-Kettentyp wird bei monoklonalen Antikörpern beschrieben. Die 19S-IgM Moleküle wiesen im vorliegenden Fall hingegen das normale Kettenverhältnis (λ:κ= 6:4) auf. Dies läßt den Schluß zu, daß 7S-IgM auch infolge Entartung nur eines bestimmten Zellklones auftreten kann.

Schließlich sind noch einige Neoplasien anzusprechen. Bei der Waldenström'schen Makroglobulinämie tritt bei

stark erhöhtem 19S-IgM nur in 20% aller Fälle 7S-IgM auf (Carter and Hobbs, 1971). Das Verhältnis 19S-IgM zu 7S-IgM ist von Fall zu Fall verschieden (Solomon and Mc Laughlin, 1970). Bei einem malignen Plasmazelltumor (Solomon and Kunkel, 1967) wird das Auftreten von 7S-IgM beschrieben, ohne daß dies mit einer Erhöhung des 19S-IgM einhergeht. Die Gründe hierfür sind vermutlich im unterschiedlichen Reifegrad der neoplastisch entarteten Plasmazellen zu suchen.
Welche pathologischen Einflüsse letztlich zur Sekretion von 7S-IgM oder aber zu dessen Bildung in noch nicht genau identifizierten Zellen (vierte Hypothese) führen, ist noch völlig ungeklärt.

Bezüglich der Funktion des 7S-IgM ist nur soviel bekannt, daß es im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis die Fähigkeit zur Komplementbindung besitzt und eine Aktivität gegenüber IgG und körpereigenen Nucleinsäuren aufweist (Harisdangkul et al., 1975). Die Frage nach der Funktion der 7S-IgM-Moleküle steht jedoch nur dann zur Diskussion, wenn das Auftreten dieser Monomere nicht als pathologisch oder genetisch bedingte Entgleisung von Regelmechanismen verstanden wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die vorliegende Literatur lassen erkennen, daß die Fähigkeit der Plasmazelle zur J-Kettenproduktion sowohl beim Huhn als auch beim Menschen begrenzt ist. Diese Begrenzung zeigt sich beim Huhn bereits im physiologischen Bereich, wird aber auch beim Menschen nach starkem antigenen Stimulus mit hierauf folgender unnatürlich hoher IgM-Produktion bei einigen Krankheiten sichtbar. Ob alle Plasmazellen oder nur bestimmte Zellklone für das Auftreten des mo-

nomeren IgM verantwortlich gemacht werden können, kann erst durch weiterführende Untersuchungen, wie z.B. durch L-Kettenanalysen endgültig geklärt werden.

Immunglobulin A:
Aviäres IgA kommt - wie auch das IgA des Säugers - in verschiedenen Aggregationsformen vor. Im Serum und in einigen Körpersekreten (Galle, Darmsekret) des Huhnes konnten monomere (7S-IgA), dimere (11S-IgA) und auch höhere Molekülaggregate (17S bis 19S-IgA) nachgewiesen werden (Leslie and Martin, 1973; Sanders and Case, 1977).

Die quantitative Gegenüberstellung des monomeren und polymeren IgA in drei Altersstufen erbrachte folgende Ergebnisse:

1. Der prozentuale Anteil des 7S-IgA am Gesamt-IgA im Serum von Kontrollhühnern beträgt im Alter von zwei Monaten ca. 55%. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Rose et al. (1981), nicht jedoch mit dem von Leslie and Martin (1973), welche nach Säulentrennung mit anschließendem qualitativen Nachweis vorwiegend polymeres IgA im Hühnerserum beschreiben.
2. Zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat steigt bei Kontrollhühnern der prozentuale Anteil des 7S-IgA auf ca. 70% an. Diese Steigerung ist auf eine Abnahme der Polymerenkonzentrationen zurückzuführen, was auch zu einem Absinken der IgA-Gesamtkonzentrationen führt.
3. Zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat ändert sich der prozentuale Anteil der Monomere am Gesamt-IgA nicht mehr. Das Haushuhn weist somit

mit einem Anteil von maximal 70% am Gesamt-IgA relativ weniger 7S-IgA im Serum auf als der Mensch mit ca. 90% (Duprey, 1980; Kutteh et al., 1982).

Normogammaglobulinämische Hühner unterscheiden sich von den Kontrollhühnern lediglich dadurch, daß sie in den drei untersuchten Altersstufen einen geringfügig niedrigeren prozentualen Monomerenanteil besitzen.

Dysgammaglobulinämische Hühner hingegen weisen bei 1,5- bis 2-fach höheren IgA-Gesamtkonzentrationen gleiche absolute 7S-IgA Konzentrationen wie Kontrollhühner auf. Somit ist die Erhöhung des IgA-Gesamtspiegels bei dysgammaglobulinämischen Tieren ausschließlich auf eine erhöhte Polymerenkonzentration zurückzuführen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen bei dieser Tiergruppe sind bezüglich der Monomerenkonzentrationen kaum Altersunterschiede feststellbar.

Allen drei untersuchten Tiergruppen gemeinsam ist die Abnahme der IgA-Gesamtspiegel mit zunehmendem Alter. Da in dieser Arbeit monomere und polymere Formen gesondert quantitativ bestimmt wurden, können für dieses Phänomen drei Hypothesen diskutiert werden:

1. Innerhalb der ersten vier Lebensmonate nimmt die Transportaktivität für dimeres IgA in die Galle oder das Darmlumen zu.
   Ein aktiver Transportmechamismus für dimere Strukturen in die Galle wurde beim Menschen (Delacroix et al., 1982), bei der Ratte (Donley et al.,1982) und auch beim Huhn (Rose et al., 1981) nachgewiesen. Als selektiver Akzeptor auf der Hepatozytenoberfläche fungiert die Sekretkomponente, welche ausschließlich dimeres IgA bindet und anschließend

durch die Epithelzelle schleust (Klingmüller und Hilschmann, 1979). Die Folge dieses Transportmechanismus ist, daß dimeres IgA 20 bis 30 Mal schneller in die Galle gelangt als die monomere Struktur, welche nur einem Konzentrationsgefälle zu folgen scheint (Rose et al., 1981).

2. Denkbar wäre ferner, daß mit zunehmender Produktionsaktivität der Plasmazelle auch vermehrt dimere Strukturen gebildet werden.
Mit dieser Hypothese könnten sowohl der relativ geringe Monomerenanteil bei dysgammaglobulinämischen Hühnern als auch der prozentual steigende Monomerenanteil bei sinkenden IgA-Gesamtkonzentrationen erklärt werden. Der momentane Kenntnisstand läßt aber genau das Gegenteil erwarten. Aus Knochenmarksgewebe gewonnene menschliche Plasmazellen zeichnen sich gegenüber solchen aus anderen Geweben (Lymphknoten, Milz, Darmmukosa) dadurch aus, daß sie eine 10- bis 30-fach höhere Produktionsaktivität besitzen, aber zu 90% monomere Strukturen sezernieren (Kutteh et al., 1982).

3. Eine mögliche dritte Hypothese wäre, daß bestimmte Plasmazellpopulationen, welche vermehrt dimere Strukturen sezernieren, mit zunehmendem Alter weniger stark regeneriert werden.

Untersuchungen am Menschen haben gezeigt, daß IgA produzierende Plasmazellen in verschiedenen Geweben unterschiedliche Verhältnisse von monomeren zu dimeren Formen sezernieren (Andre et al., 1978).
So bilden z.B. aus Knochenmarksgewebe gewonnene Plasmazellen zu 90% 7S-IgA, aus der Darmmukosa gewonnene aber nur zu 39% 7S-IgA (Kutteh et al., 1982). Die Ursache hierfür könnte in einer unterschiedlich star-

ken J-Kettensynthese der verschiedenen Plasmazellen begründet liegen (Della Corte and Parkhouse, 1973).

Änliche Verhältnisse wie beim Menschen - d.h. verschiedene Plasmazellen produzieren verschiedene Verhältnisse von Monomeren zu Polymeren - könnten auch auf das Huhn zutreffen. Hierfür sprechen die für dysgammaglobulinämische Hühner vorliegenden Ergebnisse. Die gegenüber Kontrollhühnern um das 1,5- bis 2-fache erhöhten IgA-Serumkonzentrationen sind ausschließlich auf eine Erhöhung der Polymere zurückzuführen. Würden alle IgA produzierenden Plasmazellen ähnliche Verhältnisse von monomeren zu polymeren Strukturen sezernieren, so müßten bei erhöhter Stimulation aller Plasmazellen monomeres und polymeres IgA gleichermaßen erhöht sein. Dies ist aber nicht der Fall; denn dysgammaglobulinämische Hühner besitzen mit Kontrolltieren vergleichbare absolute Monomerenkonzentrationen.

Die Abnahme der IgA-Gesamtkonzentrationen zwischen dem zweiten und sechsten Lebensmonat läßt sich am besten mit der dritten Hypothese erklären. Eine parallele Veränderung der Transportkapazität für dimeres IgA in die Galle oder das Darmlumen kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Abhängigkeit der Immunglobulinkonzentration von Geschlecht und Alter:
Die Serumimmunglobulinkonzentrationen beim Huhn wurden schon von mehreren Autoren untersucht. Hierbei wurden aber nie die beiden Geschlechter getrennt ausgewertet, obwohl seit einigen Jahren Geschlechtsunterschiede bezüglich der Immunglobulinkonzentrationen

beim Menschen und bei einigen Labornagern bekannt sind. Etwaige Konzentrationsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Hühnern wurden in dieser Arbeit miterfaßt; sowohl bei den monomeren und polymeren Strukturen, als auch bei den Serumgesamtkonzentrationen der Immunglobuline M, A und G.

Bezüglich der monomeren bzw. der polymeren Strukturen konnten bei keiner der drei untersuchten Tiergruppen Geschlechtsunterschiede festgestellt werden. Die Monomerenkonzentrationen sind vielmehr von der IgM- bzw. IgA-Gesamtkonzentration und vom Alter abhängig. Geschlechtsunterschiede waren aber für die IgM-Gesamtkonzentration im Serum von Kontrollhühnern erkennbar. Weibliche Kontrollhühner besitzen, verglichen mit den männlichen, signifikant höhere IgM-Serumkonzentrationen.
Für die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Geschlechtsunterschiede könnte ein Einfluß von Sexualhormonen angenommen werden; denn im untersuchten Zeitraum zwischen dem zweiten und sechsten Lebensmonat, in dem sich die Geschlechtsreife vollzieht, divergieren die IgM-Konzentrationen von männlichen und weiblichen Kontrolltieren zunehmend. Außerdem sprechen Untersuchungsergebnisse, die sowohl am Menschen als auch bei Versuchstieren gewonnen werden konnten, deutlich für eine Einflußnahme von Östrogenen bzw. Androgenen auf das Immunsystem:

So veröffentlichte die WHO (Stoica et al., 1978) eine Untersuchung, aus der hervorgeht, daß Frauen bis zur Menopause signifikant höhere IgM-Spiegel gegenüber ihren männlichen Altersgenossen aufweisen. Mit der hormonellen Umstimmung zur Zeit der Menopause geht ein Absinken der IgM-Spiegel einher.

An autoimmunerkrankten Mäuselinien wurde festgestellt, daß Östrogen die Antikörperbildung gegenüber körpereigener DNA beschleunigt, Androgen diese aber verlangsamt (Siiteri et al., 1980).
Das vermehrte Auftreten des Systemischen Lupus Erythematosus bei Frauen ist in der Humanmedizin bekannt und scheint im hormonellen Status der Frau begründet zu liegen (Paavonen et al., 1981; Inman, 1981).
Bei androgenempfindlichen Mäuselinien weisen die männlichen Tiere signifikant niedrigere Serumimmunglobulinkonzentrationen gegenüber den weiblichen Tieren auf (Cohn, 1979).
Eine Abhängigkeit des humoralen Antikörpertiters vom Zyklusgeschehen wurde bei der Maus nachgewiesen (Krzych et al., 1981).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Östrogenen ein positiv und Androgenen ein negativ regulierender Einfluß auf das humorale Abwehrsystem zugeschrieben werden kann (Fujii et al., 1975; Stimson and Hunter, 1980; Siiteri et al., 1980; Morton et al., 1981). Da bei in vitro Versuchen periphere Blutlymphozyten sowohl durch Östrogene als auch durch Androgene zu vermehrter IgG-Bildung stimuliert werden können (Weetman et al., 1981), wird in vivo eher eine indirekte Beeinflußung der Plasmazellen bzw. deren Vorstadien vermutet.

Diskutiert werden eine hormonelle Einflußnahme auf T-Helferzellen bzw. T-Suppressorzellen, sowie die Steuerung über einen humoralen Thymusfaktor (Paavonen et al., 1981; Stimson and Hunter, 1981). Ob dieser Faktor direkt auf B-Lymphozyten oder primär ebenfalls auf T-Suppressor bzw. T-Helferzellen wirkt, ist noch unbekannt.

Ein hormoneller Einfluß auf das Immunsystem ist somit unbestritten und scheint, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch für das Huhn zu gelten. Das Fehlen von Geschlechtunterschieden bei dysgammaglobulinämischen und normogammaglobulinämischen Hühnern der UM-B19-Linie scheint dieser Vermutung zu widersprechen; denn dysgammaglobulinämische Hähne weisen für alle drei untersuchten Immunglobulinklassen geringfügig höhere Werte als die Hennen auf. Ähnliche Verhältnisse sind aber auch im Mäuseversuch beim Vergleich der Immunglobulinkonzentrationen zwischen gonadektomierten männlichen und intakten weiblichen Tieren festzustellen (Eidinger and Garett, 1972). Gonadektomierte Männchen weisen höhere Immunglobulinkonzentrationen als nicht operierte und unbehandelte Weibchen auf. Da das Auftreten von Hodenhypoplasien und von unphysiologisch niedrigen Androgenkonzentrationen bei dysgammaglobulinämischen Hähnen bekannt ist (Lösch und Hannesschläger; in Vorbereitung), kann das Fehlen von Geschlechtsunterschieden bei dieser Tiergruppe eine hormonelle Einflußnahme auf das Immunsystem des Huhnes nur bestätigen.

In wie weit diese hormonelle Einflußnahme genetisch kontrolliert wird, ist unbekannt. Daß grundsätzlich eine genetische Kontrolle besteht, ist unbestritten. Untersuchungen am Menschen sprechen dem X-Chromosom eine entscheidende Rolle zu. Rhodes et al. (1969) und Grundbacher (1972) wiesen eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der X-Chromosomen und der jeweiligen IgM-Serumkonzentration nach. Frauen mit der Chromosomenkonstellation XXX weisen durchschnittlich ein Drittel höhere IgM-Konzentrationen auf als genetisch normale Frauen mit 2X-Chromosomen.

Verglichen dazu kann die Abhängigkeit der IgM-Serumkonzentrationen von der Anzahl der X-Chromosome für das Huhn ausgeschlossen werden; denn beim Geflügel besitzt das männliche und nicht das weibliche Tier zwei gleiche Autosomen.

Diese Tatsache erhärtet die Annahme, daß die in dieser Arbeit beim genetisch intakten Huhn beschriebenen Geschlechtsunterschiede bezüglich der IgM-Serumkonzentrationen primär hormonell bedingt sind.

5. *Zusammenfassung*

Mit Hilfe der Gelfiltration wurden Seren von zwei, vier und sechs Monate alten Haushühnern, sowie von normo - und dysgammaglobulinämischen UM-B19 Hühnern aufgetrennt und fraktioniert. Mit der Methode der Rocket-Immunelektrophorese wurden die Serumimmunglobuline IgM, IgA und IgG, sowie die Poly- und Monomere der Immunglobuline IgM und IgA quantitativ bestimmt. Männliche und weibliche Tiere wurden getrennt ausgewertet.

Die IgM-Serumkonzentrationen steigen bei allen drei untersuchten Tiergruppen vom zweiten zum sechsten Lebensmonat an.
Die absoluten Konzentrationen von monomerem IgM (7S-IgM) liegen hingegen bei den Kontroll- und normogammaglobulinämischen Hühnern in den drei Altersgruppen im gleichen Bereich (0,3 bis 0,5 mg/ml Serum).
Dysgammaglobulinämische Hühner weisen je nach Alter nicht nur 2- bis 4-fach höhere IgM-Gesamtserumkonzentrationen auf, sondern auch 2- bis 4-fach höhere 7S-IgM-Serumspiegel.

Der prozentuale Anteil der Monomere am Gesamt-IgM sinkt bei Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren vom zweiten zum vierten Lebensmonat um ca. 9% auf 24% ab und bleibt dann annähernd konstant.
Bei den dysgammglobulinämischen Tieren weisen die Monomere bereits im Alter von zwei Monaten lediglich einen Anteil von 25% auf und fallen bis zum sechsten Lebensmonat auf 18% ab.
Geschlechtsunterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

Die IgA-Serumkonzentrationen sinken insbesondere vom zweiten zum vierten, aber auch noch vom vierten zum sechsten Lebensmonat ab.
Dysgammaglobulinämische Hühner weisen in allen Altersstufen 1,5- bis 2-fach höhere Serumkonzentrationen auf.
Die absoluten Konzentrationen für monomeres IgA bleiben zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat bei allen drei Tiergruppen konstant und nehmen lediglich zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat geringfügig ab. Während Kontroll- und dysgammaglobulinämische Tiere in der jeweiligen Altersgruppe annähernd gleiche Konzentrationen aufweisen, liegen die normogammaglobulinämischen Tiere jeweils auf etwas niedrigerem Niveau.

Wird der Monomerenanteil des IgA prozentual zur IgA-Gesamtkonzentration dargestellt, so findet man, im Gegensatz zum monomeren IgM, bei Kontroll- und normogammaglobulinämischen Tieren einen prozentual deutlichen Anstieg, vor allem zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat. Dieser Anstieg ist auf die Abnahme der Polymerenkonzentrationen zurückzuführen.
Dysgammaglobulinämische Tiere weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren in allen drei Altersgruppen einen prozentual deutlich geringeren Anteil der Monomere auf. Auffallend ist bei dieser Tiergruppe eine mit dem Alter zunehmende Streuung der Meßwerte.
Normogammaglobulinämische Tiere nehmen diesbezüglich eine Mittelstellung zwischen Kontroll- und dysgammaglobulinämischen Tieren ein.
Geschlechtsunterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei der Betrachtung der Gesamtserumkonzentrationen zeichnen sich mit zunehmendem Alter bei den Kontrollhühnern Geschlechtsunterschiede für das Immunglobulin M ab. Sechs Monate alte weibliche Hühner zeigen gegenüber den männlichen Tieren signifikant höhere IgM-Serumkonzentrationen.

Dysgammaglobulinämische Hähne weisen gegenüber den Hennen geringfügig höhere Serumimmunglobulinkonzentrationen auf.

Normogammaglobulinämische Hühner zeigen keinerlei Geschlechtsunterschiede bezüglich ihres Immunglobulinmusters.

6. *Summary*

Quantitative Analysis of the Polymeric and Monomeric Fractions of IgM and IgA of Fowls

The blood serum of two, four, and six months old fowls as well as of UM-B19 fowls being normo- and dysgammaglobulinemic, respectively was separated and fractionated by gel filtration. The serum immunoglobulins IgM, IgA and IgG as well as the monomeric and polymeric fractions of immunoglobulins IgM and IgA were determined quantitatively by the 'Rocket-immunoelectrophoresis' method. The evaluation of results was carried out separately for male and female animals.

For all three studied groups of animals the IgM serum concentrations increase from the second to the sixth month of life. However, the absolute concentrations of monomeric IgM (7S-IgM) in the normogammaglobulinemic and control fowls are in the same range (0,3 to 0,5 mg/ml serum) for all three age groups. Depending on their age dysgammaglobulinemic fowls show not only total IgM concentrations two to four times as high but also exhibit two to four times higher serum levels of 7S-IgM.

In normogammaglobulinemic and control animals the monomer percentage of total IgM declines from the second to the fourth month of life by approx. 9% to reach 24% and remains roughly constant thereupon. In dysgammaglobulinemic animals the monomer percentage is only 25% already at the age of two month and drops to 18% by the sixth month.

Differences due to the sex of the fowls could not be detected.

The IgA serum concentrations decrease especially during the second to fourth month but also during the fourth to sixth month of life.
Dysgammaglobulinemic fowls exhibit 1,5 to 2 times higher serum concentrations within all age groups.
The absolute concentrations of monomeric IgA remain constant between the second and fourth month for all three groups of animals and only drop slightly between the fourth and sixth month.
Whereas in their respective age groups dysgammaglobulinemic and control animals show approximately the same concentrations, the corresponding values for the normogammaglobulinemic animals are somewhat lower.
When the monomer percentage of IgA is plotted versus the total IgA concentration one can recognize, in contrast to monomeric IgM, a significantly increasing percentage for normogammaglobulinemic and control animals, especially between the second and fourth month of life. This increase corresponds to a decrease in polymer concentration.
In comparison to the control animals dysgammaglobulinemic animals show a distinctively smaller fraction of monomers in all three age groups. Remarkable for this group of animals is the scattering of measured values, becoming worse with advancing age of the animals.
Normogammaglobulinemic animals take a mid position between dysgammaglobulinemic and control animals in this respect.
Again, differences traceable to the sex of the animals could not be established.
Inspecting the total serum concentrations, differences concerning immunoglobulin M between male and female control fowls can be detected with progressing age of

these animals. In six months old female fowls the IgM serum concentrations are significantly higher than in their male counterparts. Dysgammaglobulinemic roosters show slightly higher serum globulin concentrations than the corresponding hens.

7. *Literaturverzeichnis*

ALKJAERSIG,N., FLETCHER,A.P. and SHERRY,S.
ε-Aminocaproic acid: an inhibitor of plasminogen activation.
J. Biol. Chem., 234, 832 (1958)

ANDRÉ,C., ANDRÉ,F. and FARGIER,C.
Distribution of IgA 1 and IgA 2 plasma cells in various normal human tissues and in the jejunum of plasma IgA-deficient patients.
Clin. Exp. Immunol., 33, 327 (1978)

BIENENSTOCK,J., PEREY,D.Y.E., GAULDIE,J. and UNDERDOWN,B.J.
Chicken γA: Physicochemical and immunochemical characteristics.
J. Immunol., 110, 524 (1973)

BOHNER,H.-J.
Biologische Halbwertszeit und Umsatz von Immunglobulin-G normaler und dysgammaglobulinämischer Haushühner.
Dissertation, München 1977

BRADFORD,M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding.
Anal. Biochem., 72, 248 (1976)

CARTER,P.M. and HOBBS,J.R.
Clinical significance of 7S IgM in monoclonal IgM disease.
Brit. Med. J., 2, 20 (1971)

CLEM,W. and SMALL,P.A.
Phylogeny of immunoglobulin structure and function. I. Immunoglobulins of the lemon shark.
J. Exp. Med., 125, 893 (1967)

COHN,D.A.
Sensitivity to androgen. A possible factor in sex differences in the immun response.
Clin. Exp. Immunol., 38, 218 (1979)

DELACROIX,D.L., HUDGSON.H.J.F., McPHERSON,A., DIVE,C. and VAERMAN,J.P.
Selective transport of polymeric immunoglobulin A in a bile. Quantitative relationships of monomeric and polymeric immunoglobulin A, immunoglobulin M, and other proteins in serum, bile, and saliva.
J. Clin. Invest., 70, 230 (1982)

DELLA CORTE,E. and PARKHOUSE,R.M.E.
Biosynthesis of immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM).
Biochem. J., 136, 597 (1973)

DOOLEY,J.S., POTTER,B.J., THOMAS,H.C. and SHERLOCK,S.
A comparative study of the biliary secretion of human dimeric and monomeric IgA in the rat and in man.
Hepatology, 2, 323 (1982)

DUPREY,F.
Etude de l'activité anticorps contre l'éscherichia coli des IgA monomeriques et polymeriques la secretion jejunale, du serum, et de la salive de l'homme normal.
Gastroenterol. Clin. Biol., 4, A 19 (1980)

EDELMAN,J.M. and GALLY,J.A.
A model for the 7S antibody molecule.
Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 846 (1964)

EIDINGER,D. and GARRETT,T.J.
Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation.
J. Exp. Med., 136, 1098 (1972)

FAKUNLE,Y.M., ARANGUIBEL,F., DE VILLIERS,D., THOMAS,H.C. and SHERLOCK,S.
Monomeric (7S) IgM in chronic liver disease.
Clin.Exp. Immunol., 38, 204 (1979)

FAKUNLE,Y.M. and GREENWOOD,B.M.
Low molecular weight (7S) IgM and free light chains in the sera of patients with the tropical splenomegaly syndrome.
Clin. Exp. Immunol., 28, 153 (1977)

FEY,H., PFISTER,H., MESSERLI,J., STURZENEGGER,N. and GROLIMUND,F.
Methods of isolation, purification and quantitation of bovine immunoglobulins.
Zbl. Vet. Med., 23, 269 (1976)

FIEDLER,H., LÖSCH,U. and HÁLA,K.
Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia (IgM/IgG)
Folia biologica (Praha), 26, 17 (1980)

FLEISCHMANN,J.B., PORTER,R.R. and PRESS,E.M.
The arragement of the peptide chains in γ-globulin.
Biochem. J., 88, 220 (1963)

FUJII,H., NAWA,Y., TSCHUCHIYA,H., MATSUNO,K., FUKUMOTO,T., FUKUDA,S. and KOTANI,M.
Effect of a single administration of testosterone on the immune response and lymphoid tissues in mice.
Cell. Immunol., 20, 315 (1975)

GRUNDBACHER,F.J.
Human X chromosome carries quantitativ genes for immunoglobulin M.
Science, 176, 311 (1972)

HALPERN,M.S. and KOSHLAND,M.E.
Novel subunit in secretory IgA
Nature, 228, 1276,(1970)

HARISDANGKUL,V., McDOUGAL,J.ST., KNAPP,M. and CHRISTI,C.L.
Naturally occuring low molecular weight IgM in patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and macroglobulinemia.
J. Immunol., 115, 216 (1975)

HUNTER,A., FEINSTEIN,A. and COOMBS,R.R.A.
Immunoglobulin class of antibodies in cow's milk casein in infant sera and evidence for low molecular weight IgM antibodies.
Immunology, 15, 381 (1968)

INMAN,R.D.
Immunologic sex difference and the female predominance in systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum., 21, 849 (1978)

JAQUET,H., BURKHARD,M. and HERZIG,A.-L.
A method for demonstrating mono- and oligomeric units of IgA myeloma proteins in the mouse.
J. Immunol. Methods, 4, 359 (1974)

JEFFERIS,R.
A rapid technique for the isolation of human IgD myeloma proteins employing Ultrogel AcA 34.
J. Immunol. Methods, 9, 231 (1976)

JONES,D.
Low molecular weight IgM as a pitfall in immunoglobulin quantitation by radial diffusion.
Clin. Chem. Acta, 29, 551 (1970)

KLINGMÜLLER,D. und HILSCHMANN,N.
Reinigung und Charakterisierung der freien sekretorischen Komponente aus Human - Kolostrum.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 1895 (1979)

KOBAYASHI,K. and HIRAI,H.
Studies on subunit components of chicken polymeric immunoglobulins.
J. Immunol., 124, 1695 (1980)

KORTT,A., RUBAN,E., SCHOLZ,R., KRATZIN,H., GÖTZ,H. und HILSCHMANN,N.
Die Primärstruktur eines monoklonalen IgA1- Immunglobulins (Myelomprotein Tro),I Reinigung und Charakterisierung des Proteins der L-und H-Ketten.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 1681 (1978)

KRZYCH,U., STRAUSSER,H.R. BRESSLER,J.P. and GOLDSTEIN,A.L.
Effects of sex hormones on some T and B cell functions as evidenced by differential immune expression between male and female mice and cyclic pattern of immune responsiveness during the estrous cycle.
Prog. Clin. Biol. Res., 70, 145 (1981)

KUTTEH,W.H., PRINCE,S.J. and MESTECKY,J.
Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA.
J. Immunol., 128, 990 (1982)

LAURELL,C.B.
Antigen antibody crossed elektrophoresis.
Anal. Biochem.,10, 358 (1965)

LAURELL,C.B.
Quantitative estimation of proteins by elektrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem., 15, 45 (1966)

LEBACQ-VERHEYDEN,A.-M., VAERMAN,J.B. and HEREMANS,J.F.
A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions.
Immunology, 22, 165 (1972)

LESLIE,G.A. and CLEM,L.W.
Chicken immunoglobulins: biological halflives and normal adult serum concentrations of IgM and IgY.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134, 195 (1970)

LESLIE,G.A. and MARTIN,L.N.
Studies on the secretory immunologic system of fowl.
J. Immunol., 110, 1 (1973)

LÖSCH,U., HARTMANN,W. und RIEDEL,G.
Zur Antikörperproduktion dysgammaglobulinämischer Hühner
II. Präzipitierende Antikörper (Anti-HSA)
Z. Immun.-Forsch., 143, 16 (1972)

LÖSCH,U., WANKE,R. und MERKENSCHLAGER,M.
Antikörper-Isotypen nach Immunisierung genuin dysgammaglobulinämischer UM-B1~~8~~/Hühner.
Zbl. Vet. Med., 29, 365 (1982)

MANCINI,G. CARBONARA,A.D. and HEREMANS,J.F.
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry, 2, 235 (1965)

MARCHALONIS,I.J. and CONE,R.E.
Biochemical and biological characteristics of lymphozyt surface immunoglobulin.
Transplant. Rev., 14, 3 (1973)

MARCHALONIS,I.J. and EDELMAN,G.M.
Phylogenetic origins of antibody structure.
I. Multichain structure of immunoglobulins in the smooth dogfish (Mustelus canis).
J. Exp. Med., 122, 601 (1965)

MASSEYEFF,R., BLONDEL,J. and MATTERN,P.
Low molecular weight IgM in the serum and cerebrospinal fluid of patients infected with trypanosoma gambiense.
Z. Immun.-Forsch., 143, 291 (1972)

MORTON,J., WEYANT,D. and SIEGEL,B.
Androgen sensivity and autoimmune disease. Influence of sex and testosterone on the humoral immune response.
Immunology, 44, 661 (1981)

NISONOFF,A., HOPPER,J.E. and SPRING,S.B.
The antibody molecule.
Acad. Press, New York, (1975)

PAAVONEN,T., ANDERSSON,C. and ADLERCREUTZ,H.
Sex hormone regulation of in vitro immune response.
J. Exp. Med., 154, 1935 (1981)

PARDO,A.G., LAMM,M.E. and FRANGIONE,B.
Secretory component is covalently bound to a single sub-unit in human secretory IgA.
Molecular Immunology, 16, 477 (1979)

PARKHOUSE,R.M.E.
Non-covalent association of IgM subunits produced by reduction and alkylation.
Immunology, 27, 1063 (1975)

PERCHALSKI,J.E., CLEM,L.W. and SMALL,P.A.Jr.
7S Gamma-M immunoglobulins in normal human cord-serum.
Amer. J. Med. Sci., 256, 107 (1968)

READ,S.M. and NORTHCOTE,D.H.
Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G-dye-binding assay for protein.
Anal. Biochem., 116, 53 (1981)

RHODES,K., MARKHAM,R.L., MAXWELL,P.M.and MONK-JONES,M.E.
Immunoglobulins and the X-chromosome.
Brit. Med. J., 3, 439 (1969)

ROLLE,M. und MAYR,A.
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1978

ROSE,M.E., ORLANS,E.,PAYNE,A.W.R. and HESKETH,P.
The origin of IgA in chicken bile: its rapid active transport from blood.
Eur. J. Immunol., 11, 561 (1981)

SACHS,L.
Statistische Methoden.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1976

SANDERS,B.G. and CASE,W.L.
Chicken secretory immunoglobulin: chemical and immunological characterization of chicken IgA.
Comp. Biochem. Physiol., 56B, 273 (1977)

SANDOR,G., KORACH,St. and MATTERN,P.
7S globulin, immunologically identical to 19S gamma-I (beta 2)-M-globulin, a new protein of horse serum.
Nature, 204, 795 (1964)

SCHEIDEGGER,J.J.
Une micromethode de l'immune-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy, 7, 103 (1955)

SCHNELL,R., JEGGE,S. und RIEDER,H.P.
Bestimmung von Protein im Liquor: Vergleich der Coomassie-Blau-Methode mit dem Cu-Folin-Differentialtest.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 21, 151 (1983)

SCHRANNER,I., LÖSCH,U. und MERKENSCHLAGER,M.
Das Serumproteinmuster des Haushuhns. Vergleichende Darstellung der Serumproteine normaler und defekter Hühner.
Zbl. Vet. Med.A., 29, 327 (1982)

SIITERI,P.K., JONES,L.A., ROUBINIAN,J. and TALAL,N.
Sex steroids and the immune system -I. Sex difference in autoimmune disease in NZB/NZW hybrid mice.
J. Steroid. Biochem., 12, 425 (1980)

SMALL,P.A., KLAPPER,D.G. and CLEM,L.W.
Half-lives, body distribution and lack of interconversion of serum 19S and 7S IgM of sharks.
J. Immunol., 105, 29 (1970)

SOLOMON,A. and KUNKEL,H.G.
A "monoclonal" type, low molecular weight protein related to γM-macroglobulins.
Am. J. Med., 42, 958 (1967)

SOLOMON,A. and Mc LAUGHLIN,C.L.
Biosynthesis of low molecular weight (7S) and high molecular weight (19S) IgM.
J. Clin. Invest., 49, 150 (1970)

SPENGLER,G.A. and WEBER,R.M.
PHA selection electrophoresis - a screening method for monomeric IgM.
J. Immunol. Methods, 32, 71 (1980)

STIMSON,W.H. and HUNTER,I.C.
Oestrogen - induced immunoregulation mediated through the thymus.
J. Clin. Lab. Immunol., 4, 27 (1980)

STOICA,CH., SAMBORSCHI,C. and MICHIU,V.
Influence of sex and age on serum immunoglobulin concentrations in healthy subjects.
Med. Interne., 16, 23 (1978)

TAAL,B.G., SCHALM,S.W., DE BRUYN,A.M. and KORNMAN v.d. BOSCH,H.J.
Monomeric (7S) IgM in primary biliary cirrhosis.
Scand. J. Gastroenterol., 17, 173 (1982)

TIZARD,I.R.
Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie.
Paul Parey Verlag, 1981

VITETTA,E.S.,GRUNDKE-IQUBAL,I., HOLMES,K.V. and UHR,J.W.
Cell surface immunoglobulin.
J. Exp. Med., 139, 862 (1974)

WANKE,R.
Untersuchungen zur Immunantwort dysgammaglobulinämischer Hühner der Linie UM-B19.
Dissertation, München 1982

WEETMAN,A.P., McGREGOR,A.M., REES,B. and HALL,R.
Sex hormones enhance immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes.
Immunology Letters, 3, 343 (1981)

YALOW,R.S. and BERSON,S.A.
Immunassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin. Invest., 39, 1157 (1960)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.
Im besonderen danke ich Frau Dr. I. Schranner für die vorbildliche Betreuung.
Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merkenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Lebenslauf

24.12.1952	Geboren in Halle/Saale als Sohn von Dr. Josef Dorn und seiner Ehefrau Waltraud Dorn, geb. Kuhn
1958	Flucht aus der DDR
1959-1960	Grundschule in Berching/Opf.
1960-1963	Grundschule St. Konrad in Ingolstadt
1963-1973	Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt
8.6.1973	Allgemeine Hochschulreife
1973-1975	Soldat auf Zeit
1976	Warten auf die Zulassung zum Studium der Tiermedizin
1977-1979	Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
1979-1982	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München
27.5.1982	Staatsexamen
14.7.1982	Approbation
ab Juli 1982	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
Oktober 1982 - Juli 1983	Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München